



CENTRO UNIVERSITÁRIO LUTERANO DE PALMAS

Recredenciado pela Portaria Ministerial nº 3.607, de 17/10/05, D.O.U. nº 202, de 20/10/2005

ASSOCIAÇÃO EDUCACIONAL LUTERANA DO BRASIL

CURSO DE BIOMEDICINA

RAUL VILARES DA SILVA

ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DE HEMOGLOBINA EM AMOSTRAS DE PACIENTES ANÊMICOS NO MUNICÍPIO DE PALMAS-TO

Palmas – TO

2015

RAUL VILARES DA SILVA

**ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DE HEMOGLOBINA EM AMOSTRAS
DE PACIENTES ANÊMICOS NO MUNICÍPIO DE PALMAS-TO**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito parcial para a
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina pelo Centro Universitário
Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientador: Prof. M.Sc. Luís Fernando
Castagnino Sesti.

Co-orientador: Esp. Danilo Peres
Machado Martins.

Palmas – TO

2015

RAUL VILARES DA SILVA

**ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DE HEMOGLOBINA EM
AMOSTRAS DE PACIENTES ANÊMICOS NO MUNICÍPIO DE PALMAS-TO**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito parcial para a
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina pelo Centro Universitário
Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientador: Prof. M.Sc. Luís Fernando
Castagnino Sesti.

Co-orientador: Esp. Danilo Peres
Machado Martins.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. M.Sc Marcos Rodrigues Cintra
Centro Universitário Luterano de Palmas

Prof. M.Sc. Divino José Otaviano
Centro Universitário Luterano de Palmas

Prof. M.Sc. Luís Fernando Castagnino Sesti
Centro Universitário Luterano de Palmas

Palmas – TO

2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à minha família, que aceitou e apoiou minha decisão de ser biomédico, dando-me todos os subsídios necessários, tanto materiais quanto morais, para que esse ideal se concretizasse.

Aos meus amigos pela paciência e compreensão pelas ausências em virtude desta jornada, bem como por manterem os laços afetivos firmes mesmo quando distante.

Ao professor Luis Fernando Castagnino Sesti, pela ideia e incentivo a este trabalho, não medindo esforços para que o mesmo se tornasse possível.

Ao professor Danilo Peres Machado Martins, pelos seus conselhos e auxílios, bem como pela dedicação que tem pelos estudos sobre a hematologia e sobre as hemoglobinopatias.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, pois que nada acontece sem que seja a vontade dele.

A minha família, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim, me dando a força necessária para seguir em frente e sem a qual eu não teria chegado onde estou. Agradeço por me aturarem nesses últimos meses, por me desculparem as ausências, pelos conselhos e ajudas. Agradeço a Deus por me permitir nascer neste berço!

Ao professor Luis Fernando Castagnino Sesti, com o qual aprendi a ter mais fé e que “vai dar tudo certo!”. Agradeço por acreditar mais neste trabalho do que eu mesmo acreditei em alguns momentos, sempre me motivando e dando todos os meios para que o mesmo se concretizasse, bem como pela confiança em mim depositada.

Ao professor e amigo Danilo Peres Machado Martins, sempre solicito em ajudar e em compartilhar seus conhecimentos, sendo suas orientações de fundamental importância para as conclusões deste trabalho.

Aos professores Divino José Otaviano, Ernane Bastos, Dayane Otero, Larissa Brasil, Marcos Cintra, Marta Pavlak, Teama Wanderlei, Ayla Nubile, Jacqueline Milhomem e demais que contribuíram tanto com seus conhecimentos, experiências e vivências. Os valores transmitidos ao longo dos anos foram preciosos para minha formação e auxiliaram-me, mesmo que indiretamente, na concretização deste trabalho.

À Gleiciane e Eriadna, técnicas do Laboratório Escola, que se mostraram excelentes profissionais, sendo sempre solícitas às necessidades e grandes companheiras, mesmo quando as análises atrapalhavam seus horários.

Aos queridos amigos da Federação Espírita do Estado do Tocantins, que compõem a minha segunda família, que alicerçaram minha formação moral juntamente com meus pais, através do estudo e do trabalho. Tal formação é a que me permite enfrentar as adversidades e sempre seguir em frente nas diversas situações, seja no trabalho, nos estudos, nas atividades pessoais ou no cotidiano. Agradeço em especial aos valiosos amigos Daniel Rodrigo de Araújo, Janine Souza e Janise Mara de Souza, que são para mim exemplos e fontes de inspiração para

ser uma pessoa melhor dia após dia e a ajudar sempre que possível, de forma que agradeço a Deus a oportunidade de trabalhar e aprender com eles.

À equipe do Hemocentro, Emília, Jaqueline, Orlando e Thaís pela solicitude em me atender, cujo compartilhamento dos conhecimentos sobre as técnicas utilizadas foram de suma importância para a metodologia deste trabalho.

A turma do Estágio I 2015/2, Marília, Denilson, Danyel, Olívia, Luceny, Sandra, Layane e Jéssica (Poincaré), bem como aos professores Divino e Ernane, pelo convívio maravilhoso que foi passar este semestre tão conturbado, bem como pelos lanches!

À Lunara, Isabela e Ana Ilian pela ajuda nas análises desta pesquisa.

À Velma, da Associação dos Falcêmicos do Tocantins, por me permitir ter uma dimensão melhor sobre a Doença Falciforme, bem como pela solicitude em esclarecer sobre a doença e em auxiliar neste trabalho.

MUITO OBRIGADO A TODOS!

RESUMO

SILVA, Raul Vilar. **Análise do perfil eletroforético de hemoglobina em amostras de pacientes anêmicos no município de Palmas-TO.** 2015. 90 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Biomedicina, Centro Universitário Luterano de Palmas, Palmas/TO, 2015.

A anemia é uma alteração hematológica caracterizada pela dosagem de hemoglobina abaixo da faixa de referência para a idade e sexo do indivíduo. Várias são as etiologias de uma anemia, dentre elas, as alterações genéticas que culminam na modificação da estrutura ou produção da hemoglobina. As consequências variam conforme a quantidade de genes afetados e o tipo de modificação, podendo ser desde assintomática (como no traço falciforme, fenótipo AS) até causar anemia intensa e outros processos patológicos que afetam significativamente a qualidade de vida de seus portadores (como na doença falciforme, fenótipo SS). Mesmo os portadores da forma silenciosa podem ser afetados indiretamente, pois seus descendentes podem herdar essas alterações dos pais e desenvolver a forma patológica, sendo assim importante saberem se são portadores de alguma hemoglobina ou gene alterado. Nesse intuito, este estudo procurou identificar a presença de alterações fenotípicas da hemoglobina em pacientes anêmicos que fizeram parte da rotina de 2 laboratórios no município de Palmas-TO. Para isso, primeiramente implantou-se a técnica de eletroforese de hemoglobina no LUAC e, posteriormente, coletou-se alíquotas de sangue total desses pacientes e foram realizados exames de hemograma e eletroforese de hemoglobina. Dessas análises, constatou-se uma prevalência de hemoglobinas alteradas de 15,9%, sendo a Beta Talassemia a alteração da hemoglobina mais prevalente, com 10,6% dos casos, seguida a hemoglobina S em heterozigose, compondo 5,3% dos casos. A população estudada era composta principalmente por mulheres (82,2%) com idades variadas. 89% dos casos eram de anemia discreta, 58% do tipo Normocítica e Normocrômica e sem alterações na microscopia do esfregaço sanguíneo. As principais alterações do hemograma foram encontradas nos pacientes talassêmicos e pacientes portadores de anemia moderada. Como era esperado, a maioria dos pacientes apresentou perfil eletroforético normal, sendo possível correlacionar os casos de beta talassemia menor como causa de anemia, utilizando não somente a eletroforese de hemoglobina, mas as alterações do hemograma também como fatores complementares. Porém, a mesma relação não foi estabelecida com a hemoglobina variante S em heterozigose, de forma que ela não foi responsável pelo caso de anemia na pessoa em que fora identificada.

Palavras-chave: Hemoglobinopatias. Eletroforese. Anemia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Modelo espacial do tetrâmero da hemoglobina, com duas globinas do tipo alfa (em azul), duas do tipo beta (em vermelho) e o grupo heme (em verde) inserido em cada globina.....	17
Figura 2 – Grupo heme.....	18
Figura 3 – Esquema representativo de genes de globinas do tipo alfa (cromossomo 16) e do tipo beta (cromossomo 11).....	19
Figura 4 – Disposição dos pares de globina na molécula de hemoglobina.....	22
Figura 5 – Esquema de representação das posições das diferentes hemoglobinas no gel de eletroforese em pH alcalino.....	27
Figura 6 – Análise eletroforética de hemoglobina em pH alcalino de diferentes genótipos.....	27
Figura 7 – Esquema das posições das hemoglobinas em eletroforese de pH ácido.....	28
Figura 8 – Eletroforese de hemoglobina em pH ácido.....	28
Figura 9 – Genótipo AH (segunda amostra da direita para a esquerda), característico de talassemia alfa.....	29
Figura 10 – Elevação de hemoglobina A ₂ , característico de talassemia beta menor.....	29
Figura 11 – Esquema entre o equilíbrio nas hemoglobinas normais e o desequilíbrio nas talassemias alfa e beta.....	34
Figura 12 - Fonte para eletroforese de hemoglobina FEA-250, da CELM.....	38
Figura 13 - Cuba para eletroforese C-90, da CELM.....	38
Figura 14 - Densitômetro DS-35, da CELM.....	39
Figura 15 - Peça ausente no densitômetro (esq.) e na nova peça produzida (dir.).....	39
Figura 16 - Corrida eletroforética utilizando o procedimento descrito para o sistema DS-35, juntamente com o gráfico da leitura em 420 nm.....	41
Figura 17 - Corrida eletroforética adaptada com corante Ponceau S em sangue total e gráficos das leituras em 420 nm e 520 nm.....	42
Figura 18 - Corrida eletroforética de hemácias lavadas corada com Amido Black 10B e gráfico da leitura em 420 nm.....	42
Figura 19 - Corrida eletroforética com amostra normal (AA), traço falciforme (AS) e com doença falciforme (SS), com concentração de amostra diluída para 1g/dL.....	43

Figura 20 - Gráficos da leitura do gel da Figura 19, amostra normal (1 - AA) e Traço falciforme (2 - AS).....	44
Figura 21 - Gráficos da leitura do gel da Figura 19, amostra com doença falciforme (4 - SS).....	44
Figura 22 - Corrida eletroforética com amostras controles normal (AA), AS e SS e amostra da paciente 6, portadora de Traço Falciforme (AS).....	54
Figura 23 - Corrida eletroforética constando as amostras das pacientes 16 e 17, portadoras de Beta Talasemia Menor, com bandas de A2 aumentada e presença de hemoglobina Fetal.....	55
Figura 24 - Gráficos da leitura das amostras das pacientes 16 e 17, com a dosagem de hemoglobina A2 acima do valor de referência.....	55
Gráfico 1 - Faixa etária dos pacientes analisados.....	48
Gráfico 2 - Grau de anemia dos pacientes analisados.....	51
Gráfico 3 - Tipo de anemia identificada conforme classificação laboratorial pelos índices hematimétricos.....	52
Gráfico 4 - Principais alterações morfológicas identificadas.....	52
Gráfico 5 - Perfil eletroforético de hemoglobina das amostras analisadas.....	53
Quadro 1 – Relação entre as alterações clínico-laboratoriais e o grau de talassemia.	35
Quadro 2 – Tipos de hemoglobinas e variações na concentração entre os diferentes graus de talassemia alfa e beta.....	36
Quadro 3 - Diferença do procedimento conforme o sistema de quantificação utilizado.....	40
Quadro 4 - Comparação entre os parâmetros desenvolvidos para os sistemas DS-35 e SE-250 com os adotados na implantação da metodologia no LUAC.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação entre os diferentes tipos de hemoglobinas, composições estruturais e concentrações, de acordo com a fase de desenvolvimento do organismo.....	16
Tabela 2 – Incidência da doença falciforme entre os nascidos vivos em alguns estados que realizam a triagem neonatal.....	24
Tabela 3 – Incidência do traço falciforme entre os nascidos vivos em alguns estados que realizam a triagem neonatal.....	25
Tabela 4 – Valores normais para hemoglobinas em diferentes fases do desenvolvimento etário.....	30
Tabela 5 - Valores de referência utilizados para a análise do eritrograma conforme a idade e sexo dos pacientes.....	48
Tabela 6 - Resultados dos teste do eritrograma e da eletroforese de hemoglobina das 17 amostras analisadas.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,3-DPG	2,3-difosfoglicerato
CELM	Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos
CELMGEL	Gel para eletroforese de hemoglobina comercializado pela CELM
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEULP	Centro Universitário Luterano de Palmas
CNS	Conselho Nacional de Saúde
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético - anticoagulante
EUA	Estados Unidos da América
Glu	Ácido Glutâmico
Hb	Hemoglobina
Hbs	Hemoglobinas
Hb A	Hemoglobina A
Hb A ₂	Hemoglobina A ₂
Hb AS	Genótipo heterozigoto para hemoglobina S
Hb AC	Genótipo heterozigoto para hemoglobina C
Hb Bart's	Hemoglobina de Bart's (tetrâmero de globina gama)
Hb C	Hemoglobina C
Hb F	Hemoglobina Fetal
Hb H	Hemoglobina H (tetrâmero de globina beta)
Hb S	Hemoglobina S
Hb SC	Genótipo duplo heterozigoto para hemoglobina S e C
Hb SD	Genótipo duplo heterozigoto para hemoglobina S e D
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
LUAC	Laboratório Universitário de Análises Clínicas
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
Po ₂	Pressão Parcial de Oxigênio
POP	Procedimento Operacional Padrão
RCG	Região Controlador de Gene

RDW	<i>Red Cell Distribution Width</i> (índice que avalia a diferença de tamanho entre as hemácias)
ULBRA	Universidade Luterana do Brasil
VAC	Tensão (Volt) alternada
Val	Valina
VDC	Tensão (Volt) contínua
VCM	Volume Corpuscular Médio

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
γ	Gama
ε	Épsilon
ζ	Zeta
$\psi\zeta$	Pseudogene Zeta
$\psi\alpha$	Pseudogene Alfa
$\psi\beta$	Pseudogene Beta
β^+	Gene Beta defeituoso
β^0	Gene Beta improdutivo
CO_2	Gás Carbônico
Fe^{2+}	Ferro Ferroso
fL	Fentolitro
g/dL	Grama por decilitro
Hz	Hertz – unidade de frequência
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
pg	Picograma
W	Watt – unidade de potência elétrica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
3.1 Hemoglobina.....	16
3.1.1 <i>Função da hemoglobina</i>	19
3.1.2 <i>Hemoglobinas normais</i>	21
3.1.3 <i>Hemoglobinas variantes</i>	22
3.1.3.1 Hemoglobina S.....	23
3.1.3.2 Hemoglobina C.....	25
3.2 Eletroforese de hemoglobina.....	26
3.3 Anemia.....	30
3.3.1 <i>Doença falciforme</i>	32
3.3.2 <i>Doença da hemoglobina C</i>	33
3.3.3 <i>Talassemias</i>	33
4 METODOLOGIA.....	37
4.1 Implantação da técnica de eletroforese de hemoglobina em pH alcalino.....	37
4.2 Locais de coleta.....	45
4.3 Critérios de inclusão e exclusão.....	45
4.4 Testes realizados.....	46
4.5 Retorno ao paciente.....	46
4.6 Aspectos éticos.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
6 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICES.....	63
ANEXOS.....	82

1 INTRODUÇÃO

Anemia é uma alteração hematológica caracterizada por uma redução dos valores de hemoglobina a níveis abaixo da faixa de referência determinada conforme a idade e sexo do indivíduo (NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A., 2008). As anemias possuem etiologia variada, podendo ocorrer por uma alteração fisiológica (excesso de sangramento pela menstruação, gravidez), carência nutricional (anemias ferropriva e megaloblástica), por ação hemolítica (eritroblastose fetal ou rejeição de transfusões sanguíneas), hemorragia (cirurgias, hemofilias A e B) ou por deficiência na produção ou composição da hemoglobina, sendo chamadas de hemoglobinopatias (anemia falciforme, talassemias, doença da hemoglobina C, dentre outras).

As alterações do perfil da hemoglobina são de caráter genético, onde um ou mais genes que codificam alguma das cadeias de globina que compõem a hemoglobina sofrem alteração e passam a codificar uma hemoglobina diferente da normal (como a hemoglobina S na doença ou traço falciforme) ou deixam de produzir de forma completa ou parcial a hemoglobina normal (como as talassemias) (NAOUM, P. C., 2012).

Visto que essas alterações são de cunho hereditário e que a gravidade da anemia varia conforme o tipo e grau de modificação no gene, essas patologias são consideradas como problema de saúde pública, já que o paciente conviverá com isso por toda vida e que o número de casos tendem a aumentar com o passar dos anos (RAMALHO; MAGNA; PAIVA-E-SILVA, 2003).

Considerando que esses pacientes sofrem de anemia de grau variado e que necessitam de monitoramento constante, possivelmente a presença dos mesmos seja comum na rotina laboratorial. Diante do exposto, foram coletadas amostras de sangue de pacientes anêmicos que passaram pela rotina laboratorial de laboratórios de Palmas-TO para análise por eletroforese de hemoglobina, a fim de identificar com que frequência às alterações da hemoglobina estão presentes em portadores de anemia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar o perfil eletroforético de hemoglobina nas amostras de pacientes anêmicos que chegam aos laboratórios de Palmas-TO.

2.2 Objetivos Específicos

- Implantar o Procedimento Operacional Padrão (POP) para eletroforese de hemoglobina no Laboratório Universitário de Análises Clínicas (LUAC) do Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA);
- Analisar as amostras de pacientes anêmicos utilizando-se a técnica da eletroforese de hemoglobina e testes complementares, quando necessários;
- Identificar a prevalência com que as hemoglobinas variantes se apresentam entre os portadores de anemia e correlacionar com a idade e sexo destes indivíduos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Hemoglobina

A hemoglobina (Hb) está presente no interior dos eritrócitos, sendo responsável pelo transporte do oxigênio aos tecidos. É uma proteína de estrutura quaternária composta por quatro subunidades chamadas de globinas, sendo duas do tipo alfa (α) ou zeta (ζ) e duas do tipo beta (β), delta (δ), gama (γ) ou épsilon (ϵ). O tipo de Hb formada varia de acordo com os tipos de globinas associadas e esta associação varia conforme o estágio de desenvolvimento do organismo (NAOUM, P. C., 2012; SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009; WEATHERALL; CLEGG, 2001). A Tabela 1 mostra a relação entre os tipos de hemoglobinas, suas estruturas e concentrações conforme a fase de desenvolvimento do indivíduo.

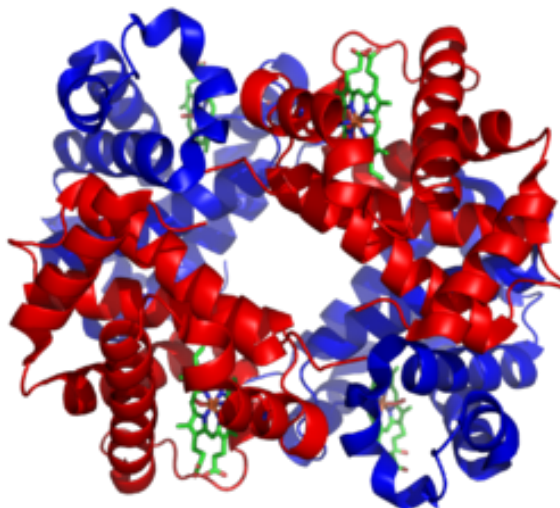
Tabela 1 – Relação entre os diferentes tipos de hemoglobinas, composições estruturais e concentrações, de acordo com a fase de desenvolvimento do organismo.

Fase da Ontogênese	Hemoglobina	Estrutura	Concentração (%)
Embrionária	Gower 1	$\zeta_2\epsilon_2$	20 – 40
	Portland	$\zeta_2\gamma_2$	5 – 20
	Gower 2	$\alpha_2\epsilon_2$	10 – 20
Fetal (*)	Fetal	$\alpha_2\gamma_2$	90 – 100
Pós-Nascimento	A	$\alpha_2\beta_2$	96 – 98
	A ₂	$\alpha_2\delta_2$	2 – 4
	Fetal	$\alpha_2\gamma_2$	0 – 1

Fonte: NAOUM, P. C., 2012.

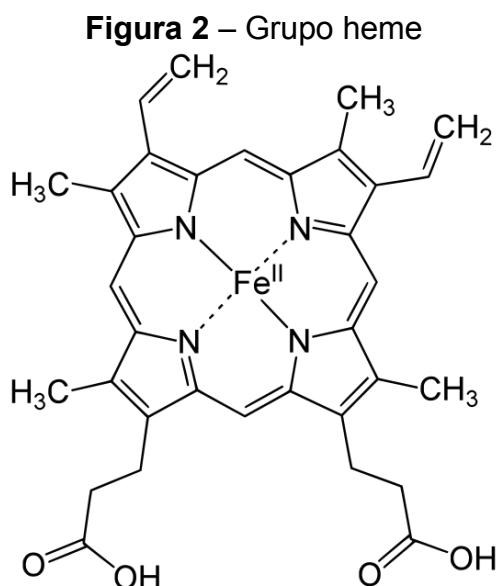
Nota: (*) Ocorre o início da formação da hemoglobina A, mas sua produção não excede a 10%.

Figura 1 – Modelo espacial do tetrâmero da hemoglobina, com duas globinas do tipo alfa (em azul), duas do tipo beta (em vermelho) e o grupo heme (em verde) inserido em cada globina.



Fonte: <http://cienciasdejoseleg.blogspot.com.br/2012/10/hemoglobina-humana.html>

As globinas são compostas por uma cadeia polipeptídica que forma uma estrutura enovelada e um grupo heme presente no interior dessa estrutura. O grupo heme é composto por 4 anéis pirrólicos (protoporfirina IX) com um átomo de ferro no estado ferroso (Fe^{2+}) em seu interior (Figura 1), sendo nesta estrutura que se liga o oxigênio (DISTRIBUIÇÃO CULTURAL DO LIVRO – DCL, 2012; PIMENTEL, 2010). A biossíntese deste grupo se dá por uma cascata bioquímica com parte das reações ocorrendo no citoplasma e parte na mitocôndria, sendo regulada pela enzima delta aminolevulinato sintetase (ALA-sintetase). A produção do heme ocorre principalmente na medula óssea (cerca de 85%), sendo que uma pequena parte é produzida no fígado. A síntese das cadeias polipeptídicas das globinas também é regulada pelo grupo heme (SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009).

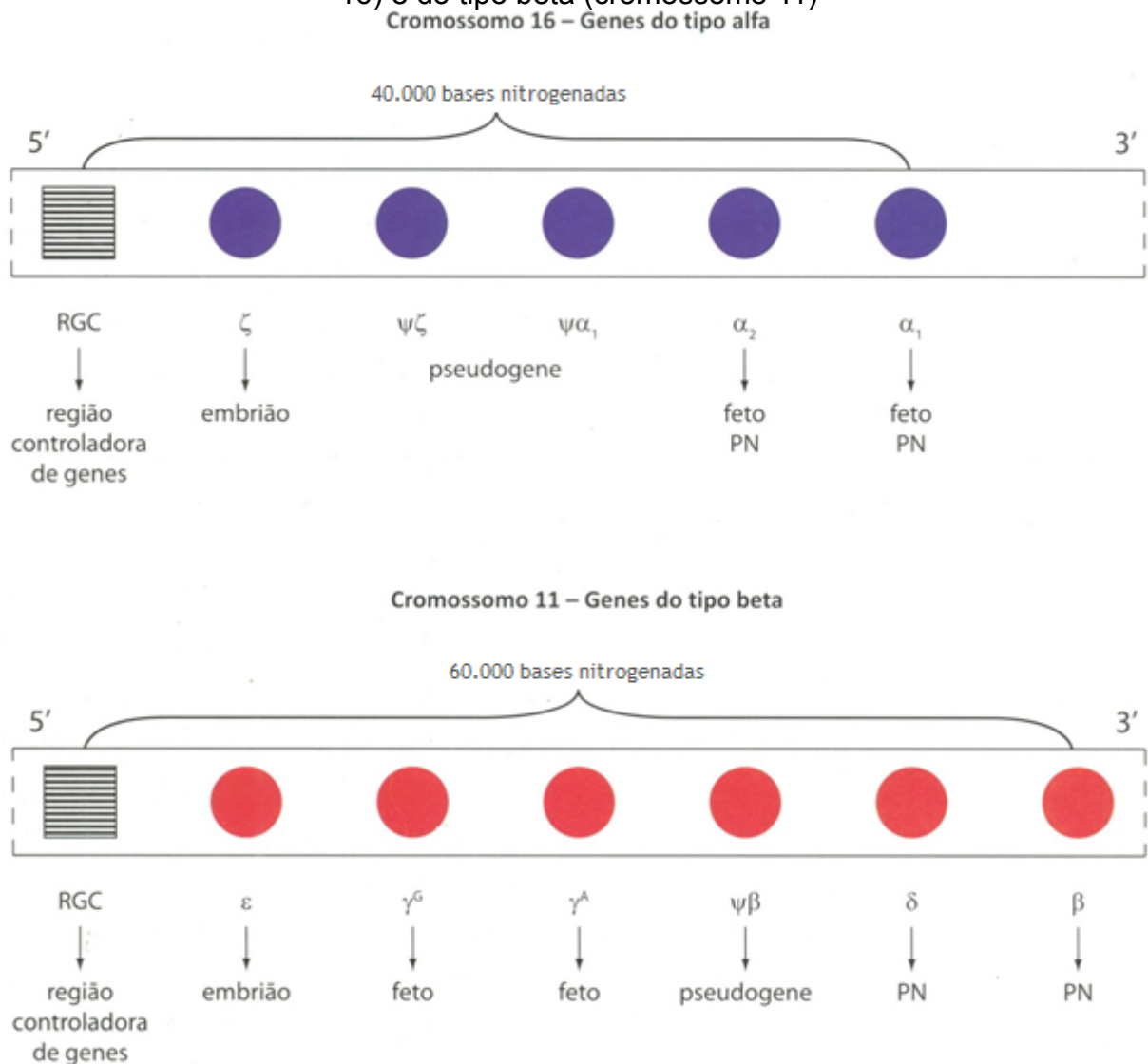


Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Heme_b.svg

As cadeias polipeptídicas das globinas são sintetizadas no retículo endoplasmático dos eritroblastos, principalmente poli e ortocromáticos, através dos agrupamentos de genes presentes nos braços curtos dos cromossomos 16 (globinas α e ζ) e 11 (globinas ϵ , γ , δ e β) (NAOUM, P. C., 2012). Conforme mostra a Figura 3, o agrupamento de genes do cromossomo 16 é composto por uma Região Controladora de Gene (RCG), pelos genes que sintetizam as cadeias ζ e α (as cadeias codificadas por α_2 e α_1 são idênticas), e por pseudogenes $\psi\zeta$ e $\psi\alpha$, que não codificam nenhuma proteína estrutural. As cadeias ζ e α são formadas por 141 aminoácidos, porém, a semelhança entre elas é de apenas 58%. Já no agrupamento

do cromossomo 11 estão os genes que sintetizam as cadeias ϵ , γ , δ e β , além de uma RCG e um pseudogene $\psi\beta$ (também não codifica nenhuma proteína). Coincidentemente, estas cadeias possuem 146 aminoácidos, mas com diferentes graus de semelhança (NAOUM, P. C. 2012; PIMENTEL, 2010; SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009).

Figura 3 – Esquema representativo de genes de globinas do tipo alfa (cromossomo 16) e do tipo beta (cromossomo 11)



Fonte: NAOUM, P. C., 2012.

Legenda: ζ : gene da globina zeta; $\psi\zeta$: pseudogene zeta; $\psi\alpha$: pseudogene alfa; α_1 e α_2 : genes da globina alfa; ϵ : gene da globina épsilon; γ^G e γ^A : genes da globina gama; $\psi\beta$: pseudogene beta; δ : gene da globina delta; β : gene da globina beta; PN: pós-nascimento.

A síntese da cadeia polipeptídica ocorre simultaneamente com a síntese do grupo heme. Estes se juntam e formam a globina (ζ , α , ϵ , γ , δ ou β), que se

aglomeram em dímeros (ζ_2 , α_2 , ϵ_2 , γ_2 , δ_2 ou β_2) para então se agruparem como estrutura quaternária (hemoglobina), tal como mostrado na Tabela 1.

3.1.1 Função da hemoglobina

A principal função da Hb é o transporte de oxigênio dos pulmões aos tecidos. Quando o sangue passa pelos alvéolos, o ferro da Hb se liga fracamente com o oxigênio, saturando a Hb e aumentando a Pressão Parcial de Oxigênio (P_{O_2}) sanguínea, que fica entre 95 e 104 mmHg. A P_{O_2} nos tecidos é menor que a P_{O_2} no sangue arterial, de forma que o oxigênio migra do sangue para os tecidos por difusão até que as pressões se tornem próximas ou idênticas (em torno de 40 mmHg). Em condições basais, somente 25% da hemoglobina oxigenada libera oxigênio aos tecidos, fato que muda durante os exercícios intensos, onde este coeficiente de utilização pode chegar entre 75 e 85%. Assim, nem todo oxigênio é liberado para os tecidos, permanecendo uma reserva de P_{O_2} no sangue. Dessa forma, destaca-se o efeito “tampão” que a Hb exerce sobre o oxigênio tecidual, mantendo seus níveis entre 15 e 40 mmHg (GUYTON; HALL, 2011).

Além da difusão, outros mecanismos estimulam a liberação de oxigênio da hemoglobina para os tecidos, como o pH, o efeito Bohr e a enzima 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG). O efeito Bohr, segundo Guyton e Hall (2011), se dá pela pressão exercida pelo gás carbônico (CO_2) que se difunde dos tecidos para o sangue, aumentando a P_{O_2} do sangue que, por sua vez, aumenta a concentração de ácido carbônico e dos íons hidrogênio (reduzindo o pH) no sangue, o que força a liberação do oxigênio pela Hb e aumenta, assim, a oxigenação dos tecidos.

A 2,3-DPG é uma enzima normalmente presente no sangue, principalmente nas hemácias e tem como função enfraquecer a ligação da hemoglobina com o oxigênio, permitindo a liberação deste mesmo diante de baixo gradiente de pressão. A ação da 2,3-DPG pode ser de forma direta, alterando as propriedades alostéricas da hemoglobina e ocasionando uma mudança conformacional da mesma, ou indireta, onde o aumento da sua concentração intraeritrocitária estimula o influxo de íons hidrogênio para o interior da hemácia, reduzindo o pH e, conseqüentemente, a afinidade da Hb pelo oxigênio (DAVID, 2009). Condições acentuadas de hipóxia elevam a concentração de 2,3-DPG, mantendo ou elevando a liberação de oxigênio da Hb aos tecidos (DAVID, 2009; GUYTON; HALL, 2011).

O CO_2 liberado pelos tecidos vai para a circulação sanguínea, sendo transportado para os pulmões, onde será expelido na expiração. No entanto, apenas

23% do CO_2 se ligam à Hb, formando a carbaminoemoglobina. 7% do CO_2 é transportado íntegro e os 70% restante reage reversivelmente com água, reação catalisada pela anidrase carbônica, formando ácido carbônico (H_2CO_3). Este ácido se dissocia em íons hidrogênio e íons bicarbonato, onde o primeiro se liga à Hb (efeito tampão) e o segundo migra para o plasma, onde exerce efeito tampão. Nos alvéolos, a elevada Po_2 desloca o CO_2 da Hb para os alvéolos (efeito Haldane), bem como reverte a reação do ácido carbônico em água e CO_2 , onde este é liberado para os alvéolos (GUYTON; HALL, 2011).

3.1.2 Hemoglobinas normais

As hemoglobinas normais são aquelas formadas pela associação dos pares de dímeros $\alpha_2\beta_2$ (hemoglobina A), $\alpha_2\delta_2$ (hemoglobina A_2) e $\alpha_2\gamma_2$ (hemoglobina fetal), além das hemoglobinas Gower 1, Gower 2 e Portland, produzidas somente na fase embrionária (NAOUM, P. C. 2012; SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009; WEATHERALL; CLEGG, 2001).

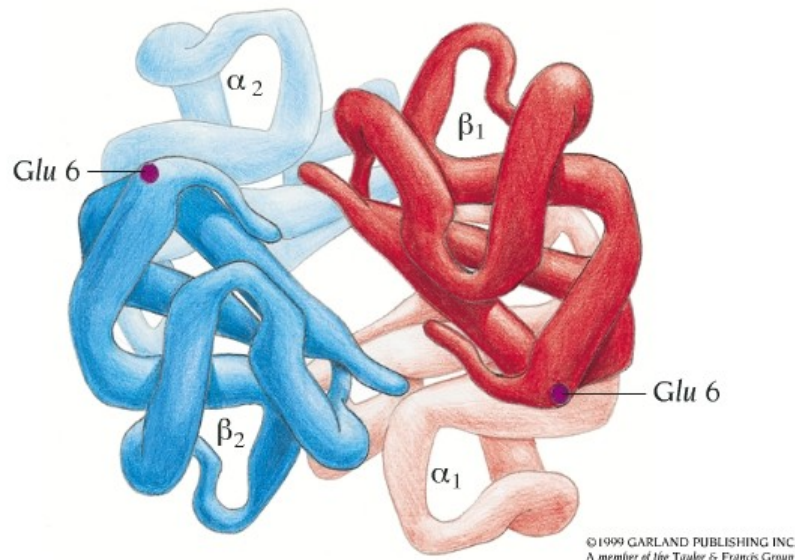
A Hemoglobina A (Hb A) é a principal hemoglobina presente no ser humano após o sexto mês de idade. Sua presença varia entre 96 a 98%, sendo seguida pela Hemoglobina A_2 , cuja concentração se encontra na faixa de 2 a 4%. Já a Hemoglobina Fetal (Hb F), como sugere o nome, é a principal Hb na fase fetal do organismo e permanece durante os primeiros meses de vida, até que seja completamente substituída pela Hb A. Na fase fetal, a sua concentração fica entre 90 a 100%, reduzindo seu valor pós-nascimento até se tornar menor que 1% (NAOUM, P. C. 2012).

Segundo Naoum, P. C. (2012), a estabilidade da estrutura na Hb se deve à disposição espacial com que os aminoácidos se encontram na molécula bem como pelas ligações físico-químicas de grau variado que ocorrem entre elas. As globinas possuem duas regiões específicas, sendo uma interna, composta por aminoácidos apolares (hidrofóbicos) e que constituem 75% da molécula, sendo, inclusive, os aminoácidos que envolvem o grupo heme; e uma externa, composta por aminoácidos polares (hidrofílicos) que fazem contato com a água, constituindo os 25% restantes.

O referido autor também comenta que a disposição tetraédrica da Hb se deve à conformação pareada dos dois pares de globina, sendo que pares homólogos se dispõem diagonalmente (Figura 4). Dessa forma, observam-se quatro conjuntos de ligações entre as globinas:

- Ligações entre $\alpha^1\beta^2$ / $\alpha^2\beta^1$: envolve o contato de 38 aminoácidos e promovem um movimento de deslizamento das globinas alfa e beta durante o processo de oxigenação;
- Ligações entre $\alpha^1\beta^1$ / $\alpha^2\beta^2$: contatos mais extensos que o anterior, envolvendo 68 aminoácidos, dando, assim, estabilidade à molécula e mantém a integridade físico-química do tetrâmero;
- Ligações entre $\alpha^1\alpha^2$: ocorre somente na forma desoxigenada da hemoglobina, sendo importante para a interação entre os grupos heme e para as trocas gasosas (efeito Bohr e transporte de CO_2);
- Ligações entre $\beta^1\beta^2$: ocorrem tanto na forma oxigenada quanto desoxigenada da Hb, sendo nela que se liga o 2,3-DPG durante a fase desoxigenada da Hb.

Figura 4 – Disposição dos pares de globina na molécula de hemoglobina



Fonte: <http://www.teliga.net/2011/07/estrutura-e-funcao-da-hemoglobina.html>

3.1.3 Hemoglobinas variantes

Alterações nos genes que codificam as cadeias polipeptídicas que compõem a Hb podem levar a produção de globinas com alteração estrutural ou desregulação da síntese equilibrada entre as diferentes globinas. Consequentemente ocorre a formação de Hbs que diferem das normais, sendo assim, chamadas de hemoglobinas variantes (KIMURA et al., 2008; NAOUM, P. C., 2012; PIMENTEL, 2010). Naoum, P. C. (2012, p. 36) conceitua as Hbs variantes como sendo moléculas que possuem “estrutura química diferente à da sua hemoglobina normal correspondente (A, A₂ ou Fetal), motivada pela mutação de uma ou mais bases

nitrogenadas, que resultam na substituição de um ou mais aminoácidos nas globinas alfa, beta, delta ou gama”.

Da mesma forma, o referido autor também comenta sobre as hemoglobinas anormais, enquadrando tanto as Hbs variantes como as Hbs normais com produção alterada, como, por exemplo, aumento na produção de Hb F e Hb A₂ na beta talassemia.

O *Globin Gene Server*, banco de dados para hemoglobinas da Universidade do Estado da Pennsylvania (EUA), até o dia 02 de novembro de 2015, registrava 1241 hemoglobinas variantes. Entretanto, somente uma pequena parcela é responsável por causar alterações clínicas significativas, recebendo estas a designação de hemoglobinopatias (NAOUM, P. C., 2012; ONDEI, 2005; PIMENTEL, 2010). Segundo Pimentel (2010) estas se dividem em dois grupos principais, sendo o primeiro o das hemoglobinopatias estruturais, onde uma substituição de um ou mais aminoácidos leva à alteração na estrutura da Hb, e o segundo das hemoglobinopatias por deficiência de síntese, onde ocorre um desequilíbrio entre as produções das cadeias do tipo alfa e do tipo beta. A este último grupo, designa-se o nome Talassemia.

As mutações que culminam nas Hbs variantes são, em sua maioria, pontuais, onde o local das substituições dos aminoácidos determinam as alterações nas propriedades físico-químicas da Hb. Substituições na superfície externa da molécula não costumam causar alterações significativas (com exceção das hemoglobinas S, C e E), enquanto que na superfície interna causam instabilidade molecular. Substituições de aminoácidos que participam dos contatos $\alpha^1\beta^2$ ou das ligações com o 2,3-DPG alteram a afinidade da Hb pelo oxigênio para mais ou para menos. Modificações dos aminoácidos ligados ou em torno do grupo heme podem causar também alterações na afinidade pelo oxigênio, na formação de metemoglobina pela oxidação do ferro ou em Hb instável. Alongamento da cadeia polipeptídica pode resultar em fenótipo talassêmico alfa ou beta (NAOUM, P. C., 2012; ONDEI, 2005; PIMENTEL, 2010).

A maioria das hemoglobinas variantes apresenta-se em heterozigose e não costumam apresentar modificações clínico-laboratoriais. Entretanto, em homozigose ou associada com outra hemoglobinopatia pode resultar em consequências que variam de grau moderado a grave (PIMENTEL, 2010; WAJCMAN et al., 2001 apud ONDEI, 2005).

Dentre as hemoglobinas variantes destacam-se as Hemoglobinas S (Hb S) e C (Hb C), não só pelo fato de causarem hemoglobinopatias (Doença Falciforme na Hb S e Doença da Hemoglobina C para Hb C) como por também serem as mais prevalentes no Brasil (LEONELI et al., 2000; ORLANDO et al., 2000).

3.1.3.1 Hemoglobina S

A hemoglobina S é formada a partir de uma mutação pontual no *códon* que codifica o sexto aminoácido, onde ocorre a substituição da base nitrogenada adenina por uma timina (GAG > GTG). Consequentemente, o aminoácido codificado deixa de ser o ácido glutâmico e passa a ser a valina (Glu > Val). Essa alteração acarreta em modificações na estrutura físico-química da molécula de Hb, culminando em uma menor afinidade de oxigênio e, sob baixa tensão de oxigênio, na formação de longas cadeias de Hb (polímeros de Hb), que deformam a hemácia, tornando-a no formato de foice (falciforme) (MORAES; GALIOTTI, 2010; NAOUM, P. C., 2012; PIMENTEL, 2010; SOUZA, D. M., 2013).

A Hb S possui origem multicêntrica, em diferentes populações asiáticas e africanas, com maior frequência em países da África Equatorial, Arábia, Índia, Israel, Turquia, Grécia e Itália, onde a prevalência pode chegar a 50% em determinadas regiões (MORAES; GALIOTTI, 2010; MURAO; FERRAZ, 2007). Acredita-se que este gene surgira como um mecanismo de proteção contra a malária, doença endêmica principalmente na África, visto que o *Plasmodium sp.* (hematozoário causador da malária) não consegue se desenvolver nas células falcizadas (WEATHERAL; CLEGG, 2001).

A presença da Hb S no Brasil se fez pela entrada de escravos trazidos do continente africano, motivo pelo qual essa hemoglobina se faz mais frequente em afrodescendentes (SOUZA, D. M., 2013; ZAGO et al., 1983 apud PIMENTEL, 2010; SOUZA, L. et al., 2013). As Tabelas 2 e 3 mostram a incidência da Hb S no Brasil nas formas homozigota (doença falciforme) e heterozigota (traço falciforme) obtidas através do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) em alguns estados.

Tabela 2 – Incidência da doença falciforme entre os nascidos vivos em alguns estados que realizam a triagem neonatal

DOENÇA FALCIFORME	
Estados	Proporção de Nascidos Vivos/Ano
Bahia	1:650
Rio de Janeiro	1:1300

Pernambuco, Maranhão, Minas Gerais e Goiás	1:1400
Espírito Santo	1:1800
São Paulo	1:4000
Mato Grosso do Sul	1:5850
Rio Grande do Sul	1:11000
Santa Catarina e Paraná	1:13500

Fonte: BRASIL, 2013.

Tabela 3 – Incidência do traço falciforme entre os nascidos vivos em alguns estados que realizam a triagem neonatal

TRAÇO FALCIFORME	
Estados	Proporção de Nascidos Vivos/Ano
Bahia	1:17
Rio de Janeiro	1:20
Pernambuco, Maranhão	1:23
Espírito Santo, Goiás	1:25
Minas Gerais	1:30
São Paulo	1:35
Rio Grande do Sul	1:65

Fonte: BRASIL, 2013.

Andrade (2012) realizou uma pesquisa para Hb S em três comunidades quilombolas do Estado do Tocantins, onde foram analisadas 233 amostras, das quais 17 (7,3%) apresentaram Hb AS, não sendo detectado nenhum homozigoto. Em um estudo semelhante, Souza, L. et al. (2013) realizaram uma pesquisa para Hb S e Hb C em quatro comunidades quilombolas do estado do Tocantins, na região do município de Brejinho de Nazaré. Das 167 amostras de sangue analisadas, 11 apresentaram hemoglobinas variantes, sendo 8 com Hb AS e 3 com Hb AC.

2.1.3.2 Hemoglobina C

Tal como na Hb S, também é formada por mutação pontual no *códon* da cadeia β que codifica o sexto aminoácido, trocando o ácido glutâmico por uma lisina (SOUZA, D. M., 2013). Esta troca altera a carga elétrica da hemoglobina, tornando-a menos negativa que as hemoglobinas A e S, de forma que sua corrida eletroforética é bem mais lenta que as demais. Além disso, essa modificação faz com que a essa Hb se cristalice no interior da hemácia e induza um estado de desidratação do eritrócito (NAOUM, P. C., 2012; SOUZA, D. M., 2013).

A Hb C também ocorre com mais frequência em africanos, servindo como mecanismo de defesa contra a malária. Desta forma, no Brasil é mais frequente em

afrodescentes (NAOUM, P. C., 2012; SOUZA, D. M., 2013; WEATHERALL; CLEGG, 2001).

A patogenia da Hb C ocorre apenas quando em homozigose no indivíduo ou associada à outra forma de hemoglobinopatia, como a Hb SC ou Hb C e talassemia (SOUZA, D. M., 2013).

3.2 Eletroforese de hemoglobina

A eletroforese é uma técnica de separação de moléculas carregadas eletricamente, implantada pelo bioquímico sueco Arne Tiselius em 1937. Esta técnica consiste na aplicação de um campo elétrico sobre uma amostra (em um determinado pH), fazendo com que moléculas com carga elétrica negativa migrem para o polo positivo e moléculas com carga positivo migrem para o polo negativo (NAOUM, P. C., 2012).

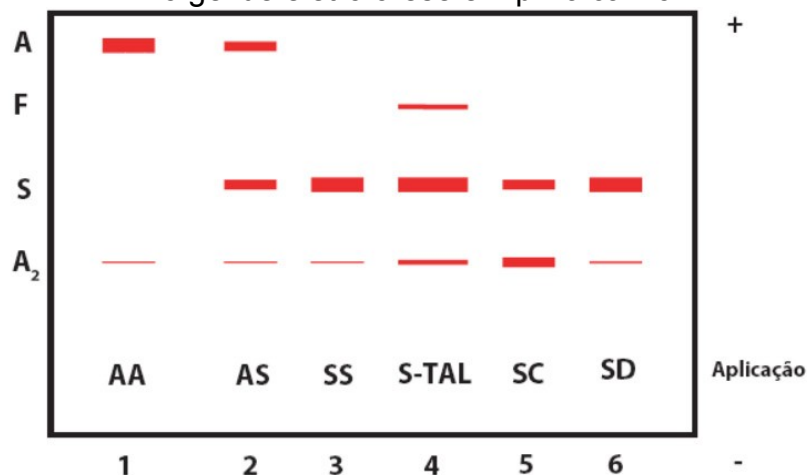
A eletroforese de Hb é feita em gel de agarose ou de acetato de celulose em cuba horizontal contendo solução tampão em pH alcalino. Essa solução tampão é de grande importância, pois a molécula de Hb normal (Hb A) possui Ponto Isoelétrico ou pI (ponto de equilíbrio das cargas elétricas dos aminoácidos) em 6,8. Isto significa que, em pH 6,8, a Hb A encontra-se em equilíbrio elétrico e, por isso, não migra para nenhum polo. Assim, a faixa de pH utilizada para o tampão de eletroforese de Hb é entre 8,5 e 9,5, pois, dessa forma, a Hb passa a ter carga elétrica negativa, migrando para o polo positivo do campo (NAOUM, P. C., 2012).

A tensão a ser aplicada e o tempo da corrida variam conforme o protocolo a ser utilizado. Por exemplo, enquanto Naoum, P. C. (2012) recomenda a aplicação de 300V por 20 minutos utilizando gel de acetato de celulose em tampão Tris-EDTA-Borato pH 8,5, a Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos – CELM (2005) recomenda a aplicação de 150V por 20 minutos em gel de agarose fornecido por ela em solução tampão Tris pH 9,5.

A eletroforese de hemoglobina é a metodologia mais utilizada para o diagnóstico das hemoglobinopatias, pois, através dela, é possível identificar a presença de hemoglobinas variantes, como Hb S, Hb C e Hb H, ou quantidades anormais das hemoglobinas A, A₂ e Fetal nas talassemias. Isso é possível porque, no caso das hemoglobinas variantes, as substituições dos aminoácidos ou das cadeias de globina (alfa talassemia) culminam na alteração da carga elétrica da hemoglobina, tornando-a mais ou menos negativa que a Hb A (NAOUM, P. C., 2012).

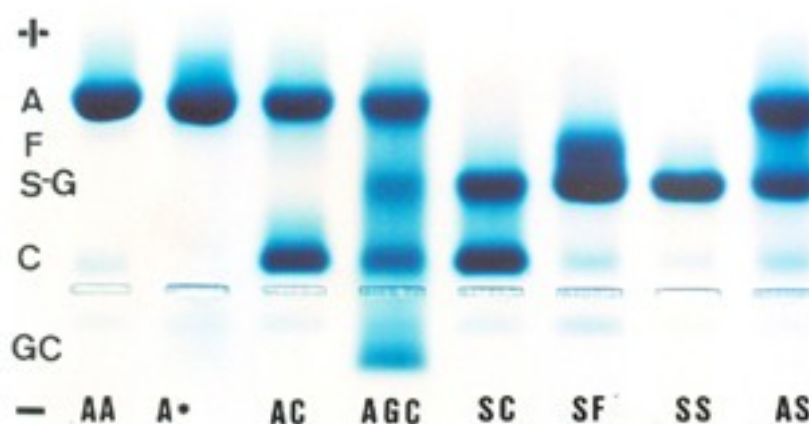
A Figura 5 mostra representativamente o esquema das posições das Hbs A, F, S e A₂, respectivamente, bem como os genótipos de cada corrida. Já a Figura 6 mostra uma corrida real de eletroforese de hemoglobina. Em ambas as imagens se observam que as hemoglobinas ficam em locais específicos no gel. A Hb A se posiciona à frente das demais, visto que possui carga mais negativa, enquanto que as Hbs A₂ e C ficaram mais próximas ao ponto de aplicação, sugerindo que tenham cargas mais positivas que as demais. Observa-se que a Hb S tem carga menos negativa que a Hb Fetal e Hb A, visto que se deslocou menos que as duas, e carga mais negativa que as Hbs A₂ e C.

Figura 5 – Esquema de representação das posições das diferentes hemoglobinas no gel de eletroforese em pH alcalino



Fonte: http://www.medicinanet.com.br/conteudos/biblioteca/2270/2_confirmacao_diagnostica.htm

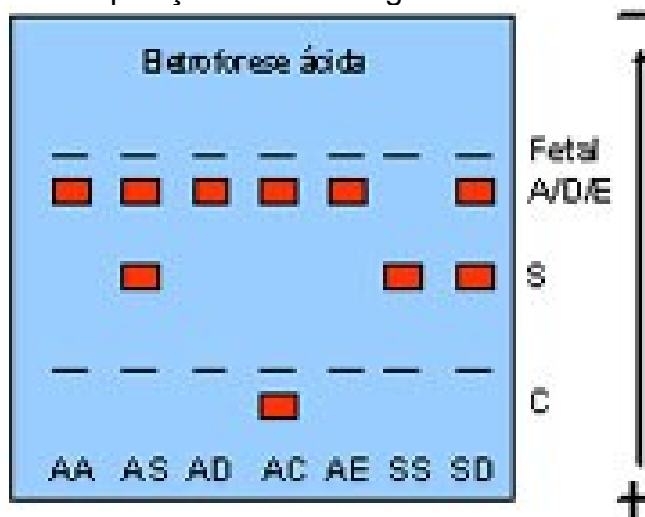
Figura 6 – Análise eletroforética de hemoglobina em pH alcalino de diferentes genótipos



Fonte: <http://www.drjeffchandler.com/2012/09/eletroforese-de-hemoglobina.html>

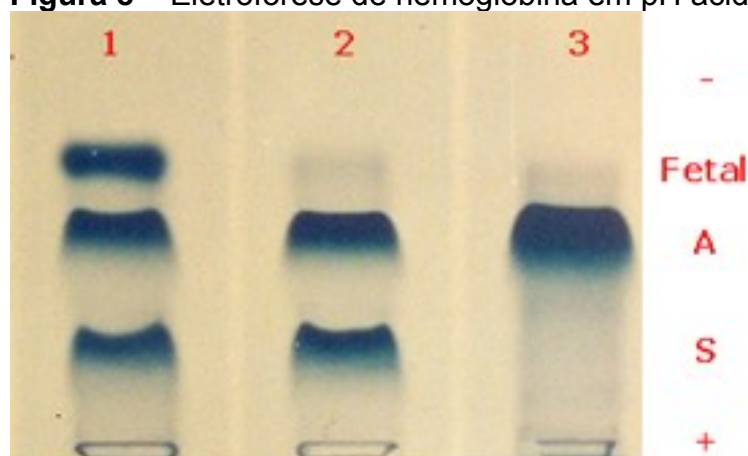
Também é possível observar nas Figuras 5 e 6 que algumas hemoglobinas se posicionaram em um mesmo local, tal como aconteceu com as Hbs S e D na Figura 5 e com as Hbs S e G e Hbs C e A₂ na Figura 6. Nestes casos, realiza-se análise diferencial por meio de eletroforese em pH ácido. O tampão ácido, com pH em torno de 6,2, faz com que as Hbs tenham carga mais positiva e migrem para o polo negativo do campo elétrico. Porém, visto que a relação de cargas muda conforme os tipos de aminoácido que compõem a globina, umas se tornarão mais positivas que outras, de forma que a localização das Hbs em meio ácido torna-se diferente do que em meio alcalino, como se pode visualizar nas Figuras 7 e 8.

Figura 7 – Esquema das posições das hemoglobinas em eletroforese de pH ácido



Fonte: <http://www.hemoglobinopatias.com.br/dialab/dialab-index.htm>

Figura 8 – Eletroforese de hemoglobina em pH ácido



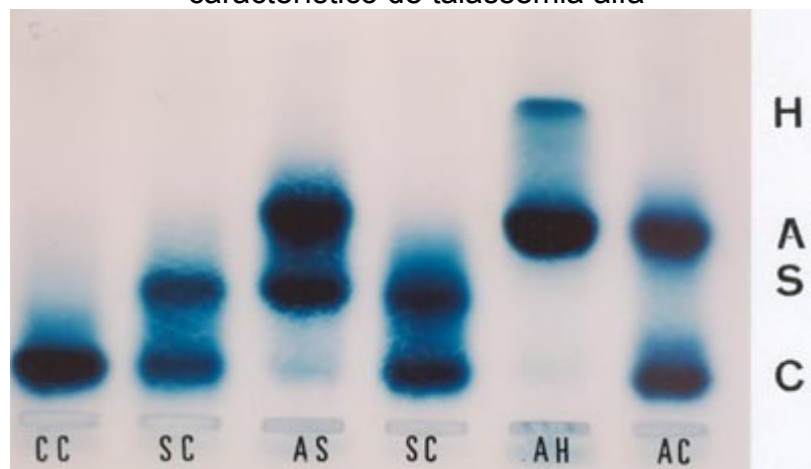
Fonte: <http://www.hemoglobinopatias.com.br/d-falciforme/diagnostico.htm>

Observa-se na Figura 7 que as Hbs variantes D e E migram na mesma posição que a Hb A, enquanto que a Hb S permanece antes das três. Já a Hb C, em

pH ácido, ainda possui carga negativa, de forma que migra para trás do local da aplicação. Na Figura 8 observa-se que a Hb Fetal migra à frente da Hb A, visto que o pH ácido faz com que ela se torne mais positiva que esta.

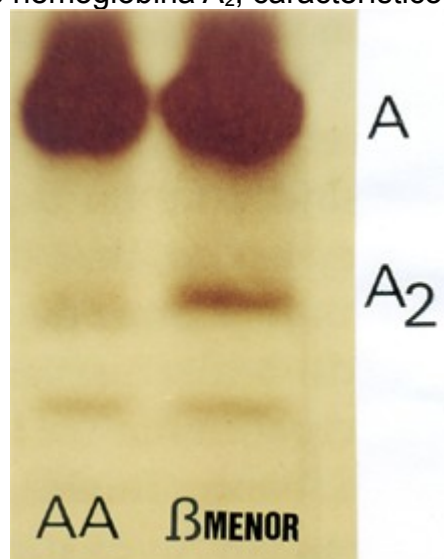
Na talassemia alfa, ocorre a formação da Hb H (tetrâmero de globina β), que migra à frente da Hb A, conforme mostra a Figura 9. Já na figura 10 visualiza-se uma amostra com hemoglobina A₂ elevada, característico de uma talassemia beta menor.

Figura 9 – Genótipo AH (segunda amostra da direita para a esquerda), característico de talassemia alfa



Fonte: <http://www.hemoglobinopatias.com.br/hemoglobinopatias/analises.htm>

Figura 10 – Elevação de hemoglobina A₂, característico de talassemia beta menor



Fonte: <http://www.hemoglobinopatias.com.br/hemoglobinopatias/analises.htm>

3.3 Anemia

A anemia é um processo resultante de uma situação patológica, sendo uma constatação clínica e laboratorial. Naoum, P. C. e Naoum, F. A. (2008, p. 61) definem anemia pela “diminuição da hemoglobina circulante em comparação com os valores esperados em pessoas saudáveis do mesmo sexo e da mesma faixa etária, sob as mesmas condições ambientais”. Na Tabela 4 podem-se visualizar as faixas de variação normal da hemoglobina em relação à faixa etária e gênero dos indivíduos.

Tabela 4 – Valores normais para hemoglobinas em diferentes fases do desenvolvimento etário

Fases Etárias	Hb (g/dL)*
Sangue de cordão	13,0 – 20,0
Primeiro dia de vida	15,0 – 23,0
Crianças de 6 meses a 6 anos	10,5 – 14,5
Crianças de 6 anos a 14 anos	11,5 – 14,5
Homem acima de 14 anos	12,5 – 16,5
Mulheres acima de 14 anos	11,5 – 15,5

Fonte: NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A., 2008.

Nota: (*): Essas faixas de normalidades variam discretamente entre diferentes laboratórios

A diminuição da hemoglobina circulante leva a um quadro de hipóxia tecidual devido à reduzida capacidade de transporte de oxigênio do sangue aos tecidos, culminando em disfunções orgânicas generalizadas (NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A., 2008; VIEIRA; FERREIRA, 2010). Os sinais e sintomas que costumam acometer pessoas com anemia são palidez, desânimo, cansaço, dores nas pernas, dispneia, palpitação, dor de cabeça, náusea, distúrbio menstrual e perda da libido. Entretanto, conforme a etiologia da anemia, outros acometimentos podem ocorrer, tornando-a mais grave (NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A., 2008).

Diversos são os fatores que causam anemia, como carência nutricional, sangramentos, doenças hereditárias, congênitas ou adquiridas, dentre outros. Apesar dos fatores nutricionais serem a principal causa de anemia no mundo (WHO, 2001), no Brasil, as anemias hereditárias causadas por modificações na Hb recebem destaque em virtude da elevada frequência dos genes alterados na população, elevada morbidade e mortalidade e pelo fato de serem incuráveis, sendo, por tanto, consideradas como problema de saúde pública (RAMALHO; MAGNA; PAIVA-E-SILVA, 2003). Devido a essa problemática, o Ministério da Saúde incluiu na Fase II

do Programa Nacional de Triagem Neonatal a realização de pesquisa para doenças falciformes e outras hemoglobinopatias (BRASIL, 2001).

Muitos estudos em diferentes localidades do Brasil comprovam a frequência das hemoglobinas variantes na população. Naoum, P. C. et al. (1987) realizaram uma pesquisa de hemoglobinas anormais em 55.217 indivíduos de 40 cidades brasileiras entre 1978 e 1985, onde identificaram um total de 1.703 (3,08%) indivíduos com hemoglobinas variantes, sendo 1.378 com variantes estruturais (1.068 com Hb S, 245 com Hb C e 65 com formas raras), 291 com talassemias e 34 com metahemoglobinemias. Os mesmos relatam que a prevalência dessas Hbs anormais foi maior na população negra em 34 das 40 cidades pesquisadas.

Em um estudo realizado por Orlando et al. (2000), com 524 indivíduos divididos em quatro populações (recém-nascidos, estudantes, doadores de sangue e anêmicos) para diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias, identificaram que 16,41% apresentaram Hbs anormais, onde 1,13% apresentavam Hb S, 0,58% Hb C, 8,01% talassemia alfa, 5,35% talassemia beta e 1,34% outros tipos de hemoglobina. Dentre as populações, a que apresentou maior presença de Hbs variantes foi o grupo dos portadores de anemia, com 44%, a maioria com talassemia alfa.

Wagner et al. (2005) analisaram a prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes em 58 pacientes comprovadamente com anemia não ferropriva e 235 pacientes controles sem anemia, em Porto Alegre-RS. Os autores constataram que 63,8% dos pacientes com anemia não ferropriva eram portadores de alguma hemoglobinopatia (32,8% com talassemia beta heterozigótica, 25,9% com talassemia alfa heterozigótica, 3,4% de heterozigose para Hb S e 1,7 de homozigose para Hb C) e, no grupo controle, 14,1% possuíam anemia hereditária (11,5% de talassemia alfa, 0,9% de talassemia beta, 1,3% de heterozigose para Hb S e 0,4% de heterozigose para Hb C).

Como se pode observar nos estudos supracitados, as Hbs S, C e as talassemias são as hemoglobinopatias mais prevalentes na população brasileira com frequência variável conforme a população, sendo estas as que exigem maior cuidado no âmbito de saúde pública (RAMALHO; MAGNA; PAIVA-E-SILVA, 2003).

3.3.1 Doença falciforme

Também conhecida como anemia falciforme, é causada pela herança homozigota da Hb S ou da interação desta com outras hemoglobinopatias, como Hb S e talassemia, Hb SC, Hb SD, dentre outras. Os portadores de apenas um gene

para Hb S não desenvolvem a doença (assintomáticos), salvaguardando quando sob desoxigenação prolongada, sendo assim designados como portadores de traço falciforme (NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A., 2008).

A falcização das hemácias leva a uma vasooclusão, processo inflamatório ocasionado pela adesão das hemácias falcizadas às células endoteliais dos vasos sanguíneos, processo que estimula a adesão de outras células e leva à ativação da hemostasia primária e secundária, culminando na formação de trombos (SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009). A vasooclusão impede o fluxo normal de sangue aos tecidos e órgãos, gerando dores ósseas, torácicas e abdominais intensas. O desenvolvimento normal do indivíduo fica comprometido, pois os fenômenos vasooclusivos afetam os sistemas nervoso, urinário, cardiopulmonar, acarretam problemas de visão e no crescimento, ocasionam anormalidades ósseas e ocorre hepatoesplenomegalia devido à intensa hemocaterese. Isso torna o paciente propenso a infecções e a formação de úlceras (NAOUM, P. C. 2012; SILVA, HASHIMOTO, ALVES, 2009).

O que interfere na qualidade de vida do portador da doença falciforme não é a anemia em si, mas sim as crises que podem ocorrer, como as crises de dor (vasooclusão), crises aplásticas (hipoproliferação ou falência medular pela depleção do estoque de folatos), crises de sequestro (o baço sequestra a massa eritrocitária, reduzindo bruscamente os níveis de Hb para menos de 6 g/dL, sendo a principal causa de mortalidade na primeira década de vida) e crises hemolíticas (elevação da bilirrubina indireta e hiperproliferação medular com redução dos níveis de Hb) (SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009).

A anemia instaurada é do tipo hemolítica (fisiopatológica), normocítica e normocrômica (laboratorial). O hemograma apresenta-se com Hb entre 5 e 11 g/dL, com presença característica de drepanócitos, codócitos, eliptócitos, policromasia, poiquilocitose e células imaturas, como eritroblastos. A contagem de reticulócitos apresenta-se elevada devido à constante hemólise. O diagnóstico pode ser feito pelo teste de falcização com metabissufito de sódio (triagem), sendo a eletroforese de hemoglobina ou HPLC os métodos confirmatórios (NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A., 2008; SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009).

3.3.2 Doença da hemoglobina C

Tal como na doença falciforme, ocorre pela herança homozigota da Hb C ou da interação desta com outras hemoglobinopatias. A Hb C se cristaliza na parte

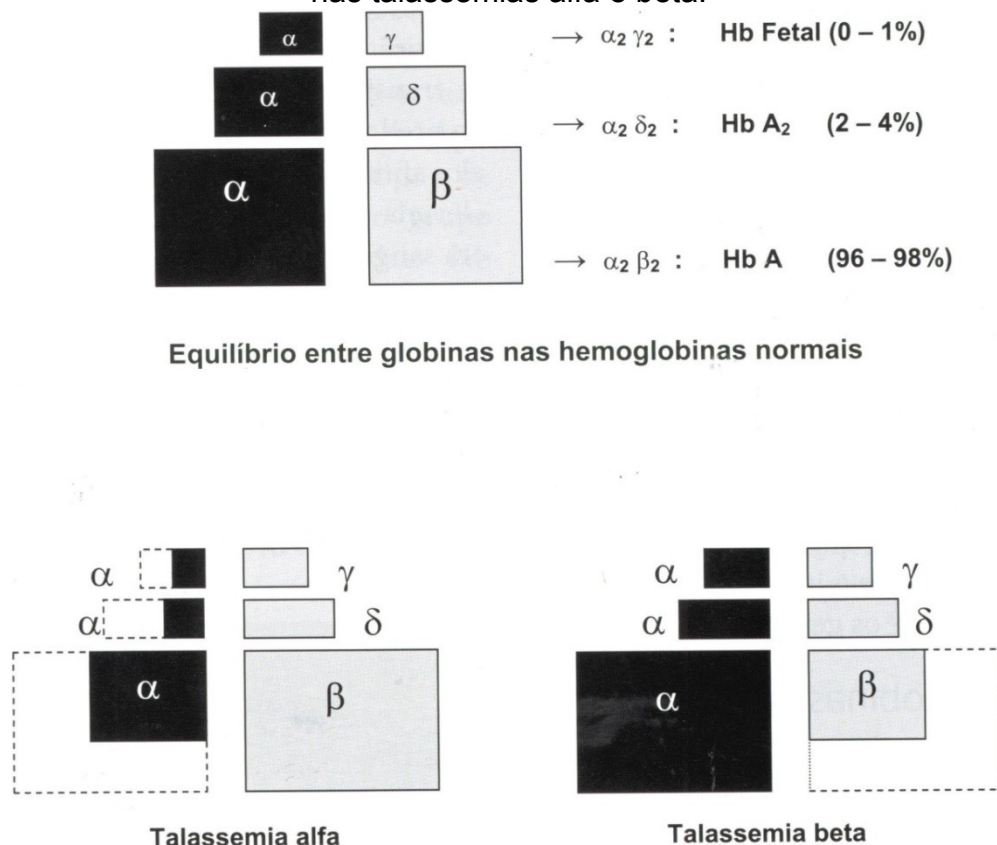
central das hemácias, formando os codócitos (células em alvo). Também é uma anemia hemolítica, mas de intensidade variável, com características clínicas de cansaço, fraqueza e, eventualmente, dores abdominais devido à esplenomegalia (NAOUM, P. C., 2012; SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009).

A extensão sanguínea de um paciente homozigoto pode apresentar até 90% de hemácias em alvo, enquanto que no heterozigoto varia de 5 a 30%. A dosagem de Hb varia entre 9 e 12 g/dL e a contagem de reticulócitos entre 2 e 7%. O diagnóstico é feito pela eletroforese de hemoglobina (NAOUM, P. C., 2012; SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009).

3.3.3 Talassemias

Segundo Silva, Hashimoto e Alves (2009) as talassemias são caracterizadas pela redução parcial ou total de uma ou mais cadeias de globina (α , β , δ , γ), principalmente das cadeias α e cadeias β , sendo assim chamadas de alfa talassemias e beta talassemias, respectivamente. Essa redução ou ausência de produção das cadeias originam-se de alterações cromossômicas que podem ser deleções (caso das talassemias alfa) ou mutações (beta talassemias).

Figura 11 – Esquema entre o equilíbrio nas hemoglobinas normais e o desequilíbrio nas talassemias alfa e beta.



Fonte: NAOUM, P. C., 2012.

Uma pessoa normal possui os quatro genes α (representados por $\alpha\alpha/\alpha\alpha$) e os dois genes β (representados por β/β). Já uma pessoa com alfa talassemia pode possuir a ausência de um gene ($-\alpha/\alpha\alpha$), de dois ($--/\alpha\alpha$ ou $-\alpha/-\alpha$), de três ($--/-\alpha$) ou dos 4 genes ($--/--$). Na beta talassemia, o paciente pode possuir apenas um gene defeituoso (β/β^+), apenas um gene que não produza cadeia beta (β/β^0), os dois genes defeituosos (β^+/β^+), um gene defeituoso e um improdutivo (β^+/β^0) ou os dois genes improdutivos (β^0/β^0) (NAOUM, P. C., 2012).

As talassemias geram um quadro de anemia hemolítica, microcítica e hipocrômica, pois as cadeias produzidas em maior quantidade ficam na forma livre ou podem se aglomerar em tetrâmeros, que se precipitam no citoplasma, de forma que estes eritrócitos são fagocitados pelos macrófagos do baço, ocorrendo hemólise extravascular (SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009).

O grau de talassemia varia conforme a quantidade de genes ausentes. Sendo assim, há quatro tipos de talassemia alfa: talassemia alfa mínima (genótipo $-\alpha/\alpha\alpha$), talassemia alfa menor ($--/\alpha\alpha$ ou $-\alpha/-\alpha$), doença de hemoglobina H (ou talassemia alfa intermédia, $--/-\alpha$) e hidropsia fetal ($--/--$) (NAOUM, P. C., 2012). Já na beta talassemia, são três tipos: beta talassemia menor (genótipo β/β^+ ou β/β^0), beta talassemia intermédia (β^+/β^+) e beta talassemia maior (β^+/β^0 ou β^0/β^0) (SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009). Da mesma forma, o grau de anemia e as manifestações clínicas variam de acordo com o déficit na produção das globinas, conforme exemplifica o Quadro 1.

Quadro 1 – Relação entre as alterações clínico-laboratoriais e o grau de talassemia.

Alterações clínico-laboratoriais	Maior	Intermédia	Menor	Mínima
Hemoglobina (g/dL)	< 7	7 – 10	10 -13	11- 15
Reticulócitos	3 – 20	3 – 10	2 – 5	1 – 2
Eritroblastos	+++	++/+	-	-
Anisopoiquilocitose	++++	+++	++/+	+/-
Icterícia	++	+/-	-	-
Esplenomegalia	+++	++	+/-	-
Alterações ósseas	+++	++	-	-
Dependência de transfusões	+++	+/-	-	-

Fonte: NAOUM, P. C., 2012.

Legenda: +: pouco; ++: moderado; +++: acentuado; ++++: intenso; -: ausente.

A talassemia alfa mínima é assintomática, com hemograma normal ou com presença de alguns micrócitos. Na alfa menor o portador pode reclamar de cansaço

e dores nas pernas com certa frequência, sendo que o hemograma apresenta discreta anemia microcítica e hipocrômica, mas com contagem de eritrócitos elevada e poucas alterações morfológicas (esquisócitos, dacriócitos e pontilhados basófilos). Na talassemia alfa intermédia ocorre uma elevada presença da hemoglobina H (tetrâmeros de globina beta), de forma que o paciente sofre de anemia moderada, com hemácias microcíticas, hipocrômicas, presença de eritroblastos e hemólise mais intensa, culminando em hepatoesplenomegalia (o portador necessita de transfusões sanguíneas e acompanhamento médico periódico). Já a hidrôpsia fetal é um caso incompatível com a vida, visto que nenhuma hemoglobina normal é formada, ocorre o acometimento dos rins, causando edema generalizado (hidropsia) no feto, com hepatoesplenomegalia, eritroblastose fetal e morte com poucas horas após o nascimento, se não ocorrer aborto espontâneo (NAOUM, P. C., 2012; NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A., 2008; SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009).

O portador da talassemia beta menor sofre de discretas manifestações clínicas, com hemograma apresentando Hb menor que 10 g/dL, discreta microcitose e hipocromia e morfologia contendo alguns codócitos e pontilhados basófilos. Na beta intermediária o paciente sofre de anemia moderada (Hb entre 7 e 10 g/dL), discreta esplenomegalia e icterícia, hemácias microcíticas, hipocrômicas, poiquilocitose com codócitos e pontilhado basófilo e presença de células imaturas (eritroblastos e reticulócitos de 3 a 10%). Na talassemia beta maior o paciente sofre de anemia acentuada (Hb em 4 g/dL), hemograma apresentando hipocromia, microcitose, poiquilocitose com codócitos, esquisócitos, siderócitos, pontilhado basófilo, anel de Cabot, presença de eritroblastos e reticulocitose (5 a 15%). A hemólise intensa eleva a atividade da medula óssea e causa icterícia, esplenomegalia e alterações ósseas, bem como eleva a suscetibilidade do paciente á infecções, de forma que este necessita de transfusões sanguíneas, medicação e vacinações específicas (NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A., 2008; SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009).

Tanto o diagnóstico confirmatório como o diferencial entre os dois tipos de básicos de talassemia é feito através da eletroforese de hemoglobina, onde, na talassemia alfa ocorre à presença de Hb H ou Hb Bart's (feto ou recém-nascido) em concentrações que variam conforme a genética herdada, enquanto que na talassemia beta ocorre um aumento das Hbs A₂ e Fetal, também variando conforme a quantidade de genes afetados (Quadro 2). Na talassemia alfa pode-se observar a

presença de precipitados de hemoglobina H nas hemácias em extensões sanguíneas coradas por azul de cresil brilhante (NAOUM, P. C., 2012).

Quadro 2 – Tipos de hemoglobinas e variações na concentração entre os diferentes graus de talassemia alfa e beta.

	Mínima*	Menor	Média	Maior
Alfa Talassemia	Traços de Hb H	Hb H: 2%	Hb H: 10 a 20%	Hb Bart's: 80 a 100%
Beta Talassemia	-	Hb A: >90% Hb A ₂ : 1,2 a 8% Hb F: 1 a 3%	Hb A: Traços Hb A ₂ : Até 10% Hb F: 30 a 100%	Hb A: Ausente Hb A ₂ : Até 8% Hb F: Até 100%

Fonte: NAOUM, P. C., 2012; SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009.

4 METODOLOGIA

Este é um estudo observacional de corte transversal que ocorreu durante o período de setembro a novembro de 2015, com o intuito de avaliar a prevalência com que as hemoglobinas variantes estão presentes entre os pacientes portadores de anemia que buscam os serviços laboratoriais, na cidade de Palmas-TO. Para isso, o trabalho foi dividido em 2 etapas principais:

- 1ª Etapa: consistiu na implantação da técnica de eletroforese de hemoglobina no LUAC do CEULP/ULBRA, utilizada para diferenciar os tipos de hemoglobina presentes no sangue dos pacientes e para quantificar as frações em percentuais;
- 2ª Etapa: coleta e análise de amostras de sangue de pacientes com anemia em dois laboratórios de Palmas-TO, empregando a metodologia implantada na primeira etapa para a identificação das hemoglobinas e testes complementares para confirmação.

4.1 Implantação da técnica de eletroforese de hemoglobina em pH alcalino

Nos meses de setembro e outubro, procedeu-se com a implantação da técnica de eletroforese de hemoglobina no LUAC do CEULP/ULBRA, compondo a primeira etapa deste trabalho. O laboratório já possuía o maquinário da Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos (CELM®) para eletroforese, composto por:

- 01 Fonte para eletroforese, modelo FEA-250 (Figura 12). Especificações:
 - Tensão de Alimentação: 110 e 220 VAC, 50/60Hz;
 - Temporizador programável de 1 a 99 minutos;
 - Tensão de saída programável de 10 a 250 VDC e ajuste de 10 em 10 VDC;
 - Corrente de saída: 40 mA por saída;
 - Consumo: 50 VA máximo.
- 02 Cubas para eletroforese, modelo C-90 (Figura 13), fabricadas em Ureol (tanto a cuba quanto o porta filme), tampa de plástico e eletrodos de grafite;
- 01 Densitômetro para análise quantitativa, modelo DS-35 (Figura 14). Especificações:
 - Tensão de Alimentação: 110 e 220 VAC, 50/60Hz;
 - Potência: 60W;

- Comprimentos de Onda: 420 nm (vermelho), 520 nm (verde) e 600 nm (azul);
- Comprimento da varredura programável de 10 até 60 mm;
- Lâmpada excitatória de tungstênio.

Figura 12 - Fonte para eletroforese de hemoglobina FEA-250, da CELM



Figura 13 - Cuba para eletroforese C-90, da CELM

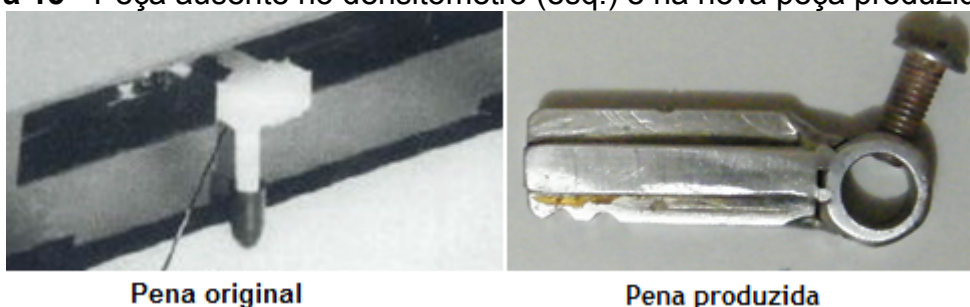


Figura 14 - Densitômetro DS-35, da CELM



Primeiramente verificou-se o estado dos equipamentos e o funcionamento dos mesmos, sendo constatada a falta de uma peça (“pena” – Figura 15) no densitômetro responsável pelo desenho do gráfico. Essa peça teve que ser fabricada em um torneiro pelo fato da produção deste equipamento estar descontinuado a mais de 10 anos. A nova “pena” (Figura 15) foi produzida de forma que pudesse ser utilizada com uma caneta comum, facilitando o uso do equipamento.

Figura 15 - Peça ausente no densitômetro (esq.) e na nova peça produzida (dir.)



O kit utilizado foi o CELMGEL® Hemoglobina Alcalina, da CELM. Cada kit é formado por um frasco com reativo hemolisante composto por Saponina, EDTA, Azida Sódica e água deionizada, e 5 invólucros contendo duas placas de poliestireno, sobre as quais encontram-se um filme com gel composto por Agarose, Sacarose, Álcool Polivinílico 1,5% e Tampão Tris pH 8,6 (CELM, 2005). Cada filme

possui capacidade para 10 corridas, de forma que um kit pode realizar até 100 corridas. Optou-se por utilizar este kit pelo fato da cuba ser específica para esse gel, visto que é do mesmo fabricante, e por não permitir o uso de outros filmes, como acetato de celulose, sem que sejam feitas adaptações no sistema. Outro motivo foi quanto à capacidade da fonte, pois que, em outras metodologias a tensão recomendada é de 300 VDC, enquanto que esta fonte fornece até 250 VDC e o CELMGEL® exige apenas 150 VDC.

O tampão de corrida utilizado foi o Tris pH 9,5±0,2 também da CELM, visto que é próprio para o sistema utilizando o CELMGEL®.

A bula do referido kit descreve o procedimento da técnica de acordo com o sistema utilizado para quantificação, sendo eles o DS-35 (descontinuado) que utiliza o densitômetro, e o outro é o SE-250 (mais recente), que faz a leitura do gel em escâner e a quantificação pelo software SDS-60, também da CELM. O Quadro 3 mostra as principais diferenças do procedimento entre os dois sistemas.

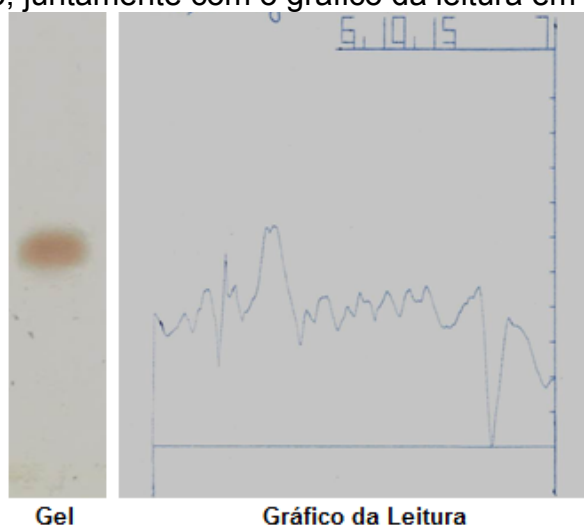
Quadro 3 - Diferença do procedimento conforme o sistema de quantificação utilizado

	DS-35	SE-250
Tipo de amostra	Sangue total	Hemácias lavadas
Hemolisado	Puro	Diluído para concentração de 1g/dL
Volume aplicado no gel	0,5 µL	1 µL
Corante	Sem corante	Ponceau S

Inicialmente foi testado o procedimento para o DS-35, visto que é o sistema de que o LUAC dispõe, porém, como os resultados não foram satisfatórios, realizaram-se testes com o procedimento para o SE-250 adaptado para o densitômetro. A fim de tornar a metodologia operante, testou-se também modificação no tipo do corante, com Amido Black 10B, conforme preparação descrita por UNESP (2003) e também a leitura com os diferentes comprimentos de onda disponíveis no densitômetro.

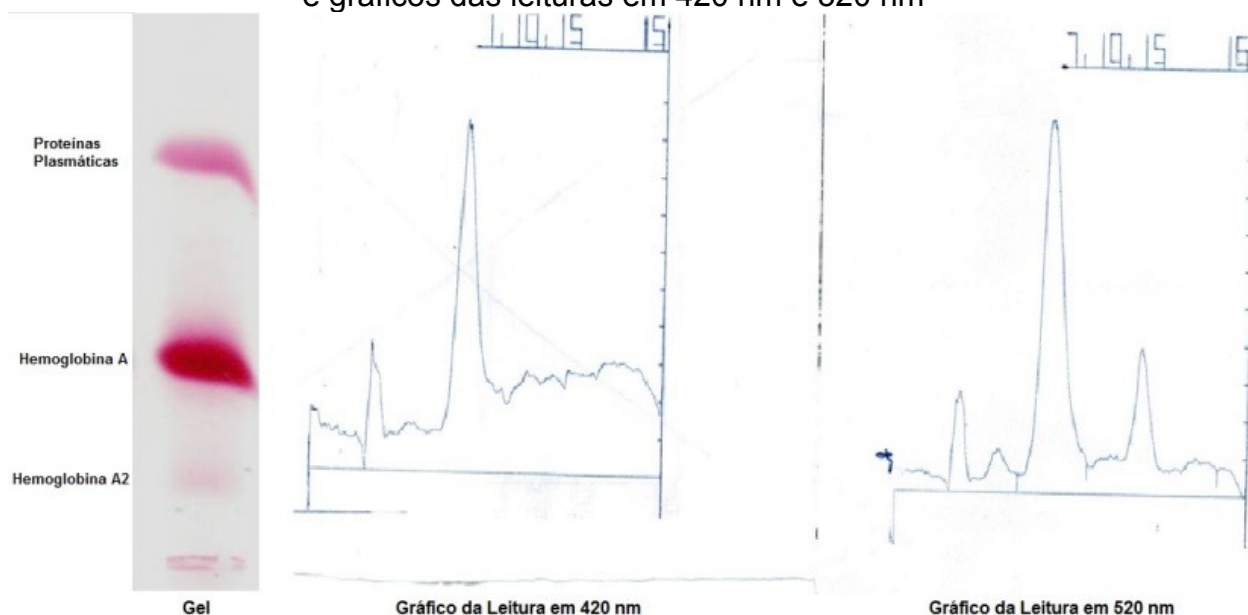
A Figura 16 mostra a corrida realizada conforme o procedimento para o DS-35, juntamente com o gráfico da leitura em filtro de 420 nm. Pode-se observar uma falta de nitidez da corrida e elevado ruído no gráfico, não sendo possível identificar um pico nítido e nem quantificar a hemoglobina independente do comprimento de onda utilizado.

Figura 16 - Corrida eletroforética utilizando o procedimento descrito para o sistema DS-35, juntamente com o gráfico da leitura em 420 nm



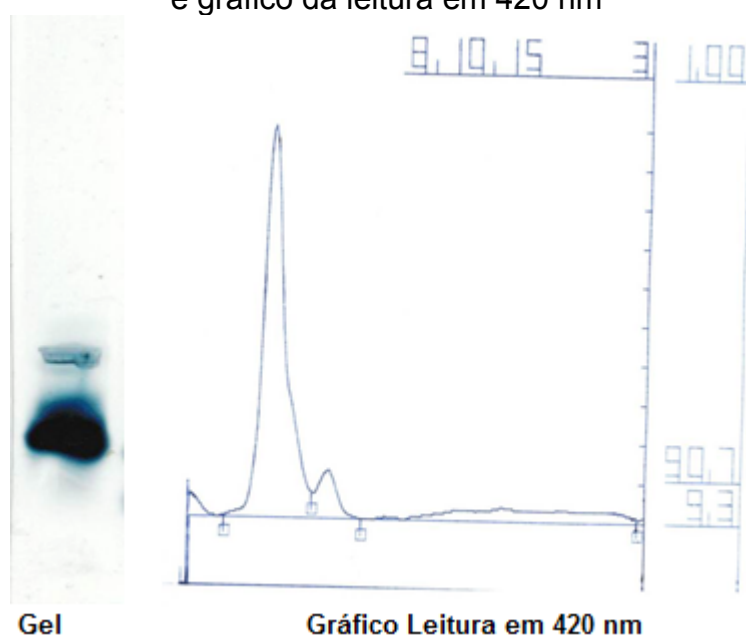
A Figura 17 mostra a corrida parcialmente adaptada com o procedimento para o SE-250, sendo aplicado hemolisado preparado com sangue total, sem diluir, volume de 1 μ L e corado com Ponceau S. Observou-se uma melhor visualização das bandas A2 e A, porém, como a amostra é de sangue total, foram coradas as proteínas plasmáticas após a banda A, em posição semelhante à Hb H, o que poderia atrapalhar a interpretação da corrida. O desenho do gráfico em 420 nm melhorou em relação à Figura 17, porém, o equipamento não conseguia quantificar. Ao alterar o comprimento de onda para 520 nm (verde), a resolução do gráfico melhorou e o equipamento foi capaz de quantificar as bandas, porém, com certo grau de ruído ainda.

Figura 17 - Corrida eletroforética adaptada com corante Ponceau S em sangue total e gráficos das leituras em 420 nm e 520 nm



A Figura 18 mostra a corrida feita com hemácias lavadas com solução fisiológica a 0,9%, sendo aplicado 1 μ L de hemolisado concentrado e o gel corado com Amido Black 10B. A imagem mostra a corrida curta devido à inversão da polaridade sobre o gel, de forma que a amostra correu para o sentido contrário. Apesar disso, a leitura do gráfico em 420 nm apresentou nitidez melhor que nos demais testes.

Figura 18 - Corrida eletroforética de hemácias lavadas corada com Amido Black 10B e gráfico da leitura em 420 nm



Já a Figura 19 mostra uma corrida feita com hemolisado preparado com hemácias lavadas e diluído com água deionizada, ajustando a concentração de hemoglobina para 1g/dL. O volume pipetado foi de 1 μ L, o gel foi corado com o Amido Black 10B. Observou-se que a resolução das bandas melhoraram consideravelmente, facilitando a análise qualitativa. Quanto à leitura dessas bandas no densitômetro com comprimento de onda de 420 nm (Figuras 20 e 21), obteve-se um gráfico nítido e com baixo nível de ruído. A única ressalva se torna a imprecisão na quantificação da Hb A2 em pacientes normais, onde o equipamento não é capaz de determinar automaticamente e dosagem manual exige muito do operador.

Figura 19 - Corrida eletroforética com amostra normal (AA), traço falciforme (AS) e com doença falciforme (SS), com concentração de amostra diluída para 1g/dL

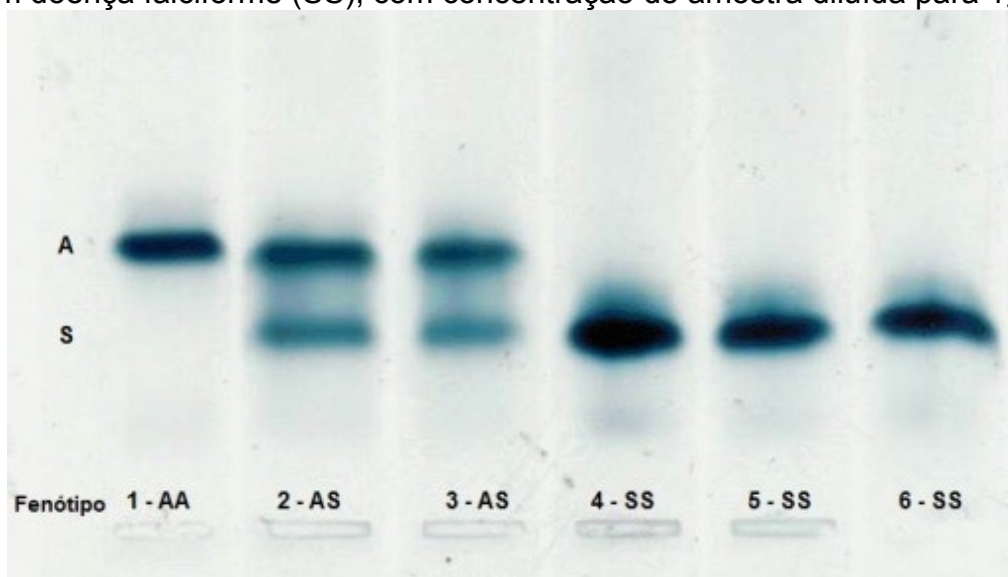


Figura 20 - Gráficos da leitura do gel da Figura 19, amostra normal (1 - AA) e Traço falciforme (2 - AS)

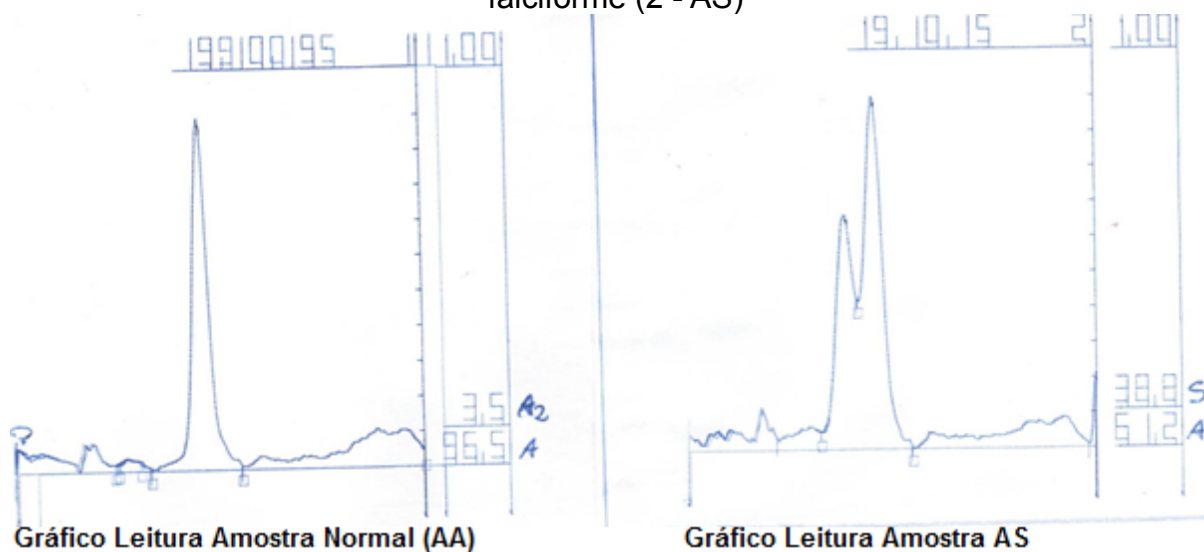
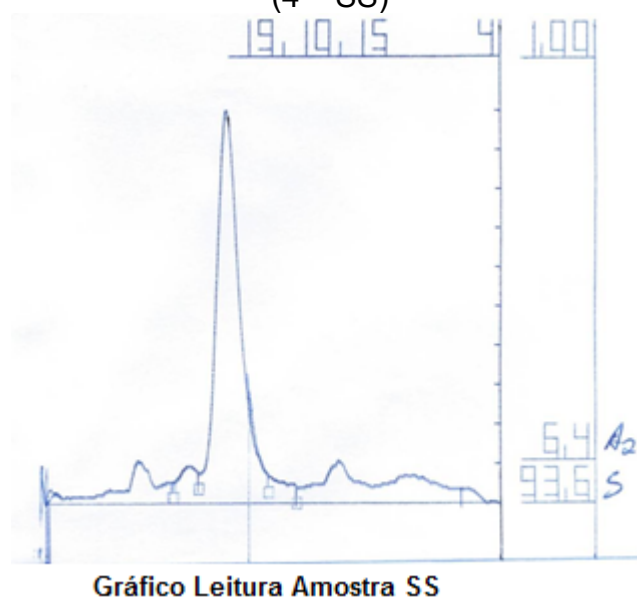


Figura 21 - Gráficos da leitura do gel da Figura 19, amostra com doença falciforme (4 - SS)



Dessa forma, foram estabelecidos como padrão o hemolisado com hemácias lavadas, diluído, volume de aplicação de 1 μ L, corante Amido Black 10B e leitura do densitômetro em 420 nm. O Quadro 4 mostra os parâmetros dos procedimentos entre os dois sistemas e os adotados para a implantação no LUAC. O procedimento completo está contido no POP (Apêndice F).

Quadro 4 - Comparação entre os parâmetros desenvolvidos para os sistemas DS-35 e SE-250 com os adotados na implantação da metodologia no LUAC

	DS-35	SE-250	Parâmetros Adotados
Tipo de Amostra	Sangue total	Hemácias lavadas	Hemácias lavadas
Hemolisado	Puro	Diluído para concentração de 1g/dL	Diluído para concentração de 1g/dL
Volume aplicado no gel	0,5 µL	1 µL	1 µL
Volume de tampão de corrida	80 mL	80 mL	100 mL
Tensão aplicada	150 VDC	150 VDC	150 VDC
Tempo de Corrida	20 min	20 min	20 min
Corante	-	Ponceau S	Amido Black 10B
Procedimento de Descoloração	-	Solução descorante (20 min) Ácido acético a 5% (10min)	Solução descorante (20 min) Ácido acético a 5% (10min)
Comprimento de Onda de leitura	420 nm	-	420 nm

4.2 Locais de coleta

As alíquotas de sangue foram coletadas de 2 laboratórios, sendo eles o LUAC e outro laboratório que aceitou auxiliar com a pesquisa e assinou a Declaração de Coparticipação (Apêndice D), no período entre outubro e novembro de 2015. Juntamente com as alíquotas, foram coletados os dados da série vermelha dos hemogramas neles realizados e os dados pessoais do paciente como idade e sexo foram obtidos durante a aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndices A e B).

4.3 Critérios de inclusão e exclusão

Foram coletadas somente as alíquotas que obedeceram aos seguintes critérios de inclusão: pacientes que assinaram o TCLE e, no caso de menores 18 anos, o TCLE e o Termo de Assentimento do Menor (Apêndices A, B e C) conforme a Resolução 466/12 do CNS, amostras de sangue total colhidas com anticoagulante EDTA e que apresentaram dosagem de hemoglobina abaixo do valor de referência para respectiva idade e sexo do paciente ($Hb < 11,5$ g/dL em pacientes com menos de 15 anos, independente do sexo; $Hb < 12$ g/dL em pacientes do sexo feminino

com idade ≥ 15 anos; Hb < 14 g/dL para pacientes do sexo masculino com idade ≥ 15 anos).

Não foram aliqüotadas amostras de pacientes gestantes, em virtude de possuírem uma anemia fisiológica em decorrência da gravidez, não necessariamente por causa de uma hemoglobinopatia; pacientes com idade menor ou igual a 1 ano, pois há possibilidade de ainda possuírem hemoglobina fetal, podendo ocasionar um falso-positivo para beta talassemia; amostras contendo coágulos, hemólise ou congeladas, por interferirem na análise eletroforética e nos testes complementares.

4.4 Testes realizados

Todas as alíquotas foram analisadas no LUAC. Realizou-se o hemograma somente nas amostras coletadas no LUAC e, em todas as alíquotas, a análise da morfologia celular do esfregaço sanguíneo corado pelo Panótico e a eletroforese de hemoglobina alcalina conforme descrito no item 4.1 e no POP (Apêndice F).

Foram utilizados como testes confirmatórios para Hb S o teste de falcização. Para confirmação da Hb C foi utilizado apenas a eletroforese de hemoglobina ácida em pH 6,2 com a metodologia de Naoum, P. C. (2012) adaptada (POP – Anexo A).

Foram utilizados para as análises estatísticas os resultados da análise qualitativa das eletroforeses e hemoglobina e dos testes complementares quando realizados, as informações de idade e sexo dos pacientes, a descrição da morfologia eritrocitária e os dados da série vermelha do hemograma, como contagem de eritrócitos, dosagem de hemoglobina, hematócrito, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e o índice que avalia a diferença de tamanho entre as hemácias, o *Red Cell Distribution Width* (RDW).

4.5 Retorno ao paciente

Durante o convite ao paciente para participação na pesquisa, o mesmo fora esclarecido quanto à sua participação e que os resultados seriam disponibilizados para retirada no LUAC. Os resultados disponibilizados são os da análise eletroforética e o hemograma (quando realizado no LUAC). Juntamente com os resultados, entregue uma Carta Devolutiva (Apêndice E), agradecendo-o pela participação nesta pesquisa, explicando os resultados obtidos e recomendando que o mesmo procure um hematologista, caso identificada uma alteração na eletroforese, ou um clínico de sua preferência quando somente apresentar anemia.

4.6 Aspectos éticos

Para este estudo foram respeitados todos os preceitos contidos na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), sendo o projeto do mesmo submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CEULP/ULBRA (Anexo A).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas amostras de 19 pacientes que estavam em conformidade com os critérios de inclusão e exclusão. A Tabela 5 mostra os valores de referência utilizados para a análise dos eritogramas dos pacientes coletados dos laboratórios.

Tabela 5 - Valores de referência utilizados para a análise do eritograma conforme a idade e sexo dos pacientes

	< 8 anos	Entre 8 e 14 anos	≥ 15 anos	
			Feminino	Masculino
Eritrócitos (Tera/L)	4,0 a 5,1	4,0 a 5,2	4,0 a 5,5	4,0 a 6,0
Hemoglobina (g/dL)	11,5 a 15,5	11,5 a 15,5	12 a 16	14 a 18
Hematócrito (%)	34 a 45	35 a 45	37 a 47	41 a 51
VCM (fL)	60 a 90	80 a 90	82 a 92	82 a 92
HCM (pg)	27 a 32	27 a 32	27 a 34	27 a 34
CHCM (g/dL)	31 a 36	31 a 36	32 a 36	32 a 36
RDW (%)	11 a 15	11 a 15,1	11 a 15,1	11 a 15,1

Legenda: VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW = *Red Cell Distribution Width*; fL = Fentolitro; pg = Picograma; g = Grama; dL = Decilitro; L = Litro.

Nota 1: Estes valores são utilizados como referência pelos laboratórios que participaram da pesquisa.
Nota 2: Os valores de referência para as idades menores que 15 anos são os mesmos para ambos os gêneros.

A Tabela 6 mostra a relação da idade e do sexo dos pacientes cuja amostra foi analisada e os resultados dos seus respectivos eritogramas e eletroforese de hemoglobina. O grupo analisado fora composto por 84,2% ($n = 16$) de pacientes do sexo feminino 15,8% ($n = 3$) do sexo masculino, com idades variando entre mínima de 7 anos e máxima de 68 anos (Gráfico 1), sendo a média de idades em 36 anos.

Gráfico 1 - Faixa etária dos pacientes analisados

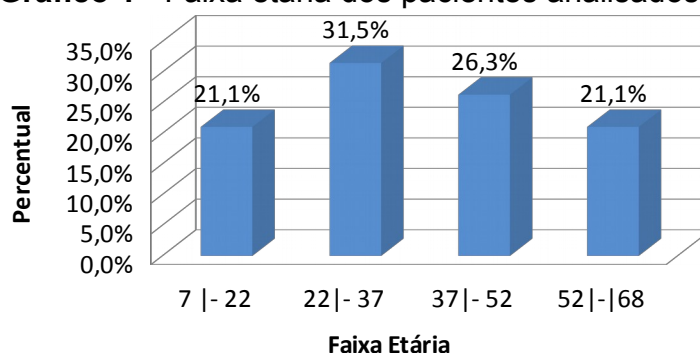


Tabela 6 - Resultados dos teste do eritograma e da eletroforese de hemoglobina das 19 amostras analisadas

Tabela 3 - Resultados dos testes de Hemograma e da Eletroforese da Hemoglobina das 10 amostras analisadas														
	Idade (anos)	Sexo (M/F)	Hemograma - Série Vermelha								Eletroforese de Hemoglobina			
			Eritrócitos (Tera/L)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHC M (g/dL)	RDW (%)	Morfologia Eritrocitária	A	A2	S	C
1	59	M	4,75	11,4	34,4	72	24	33,2	13,8	Microcitose e hipocromia discretas, poiquilcitose com presença de micrócitos, codócitos e leptócitos.	97,7	2,3	-	-
2	28	F	3,59	11,1	32,2	90	31	34,6	12,8	Normocitose e normocromia.	97,2	2,8	-	-
3	46	F	4,11	11,1	33,2	81	26,9	33,3	11,9	Microcitose e hipocromia discretas.	97,2	2,8	-	-
4	29	F	3,62	11,4	32,9	91	31,6	34,8	11,7	Normocitose e hipocromia discreta.	96	4	-	-
5	7	M	3,91	11,4	33,2	85	29,2	34,4	11,9	Normocitose e hipocromia discreta.	97,5	2,5	-	-
6	18	F	3,68	11,2	32,8	89	30,4	34,1	11,8	Normocitose e normocromia.	54,2	1,1	44,7	-
7	24	F	4,21	8,5	26,7	63	20,1	31,7	14,6	Microcitose e hipocromia moderadas, poiquilcitose, com predomínio de micrócitos e presença de leptócitos, acantócitos, esquisócitos e dacriócitos.	97,6	2,4	-	-
8	31	F	3,59	11,5	32,9	92	31,9	31,9	11,2	Normocitose e hipocromia discreta.	97,8	2,2	-	-
9	20	F	3,86	11,2	33,1	86	29	33,8	11,5	Normocitose e hipocromia discreta.	96,3	3,7	-	-
10	23	F	3,87	11,4	34,4	89	29,3	33,1	11,5	Normocitose e normocromia.	96,5	3	-	-

11	15	F	3,83	11	31,7	83	28,8	34,7	12,4	Normocitose e normocromia.	97	3	-	-
12	68	F	4,09	10,9	31,8	78	26,7	34,3	13,9	Normocitose e hipocromia discreta.	98,2	1,8	-	-
13	45	F	3,94	11,3	32,5	83	28,8	34,8	12,6	Normocitose e normocromia.	96,5	3,5	-	-
14	55	F	3,89	11,9	34,4	89	30,5	34,4	13,8	Normocitose e normocromia.	98,2	1,8	-	-
15	62	M	3,54	10,2	31	87	28	33,1	12,1	Normocromia e presença de leptócitos	97,6	2,4	-	-
16	22	F	5,34	10,5	34,9	65	19,7	30	13,7	Microcitose e hipocromia moderadas, poiquilocitose, com predomínio de micróцитos e presença de leptócitos, dacriócitos, esquisócitos e codócitos.	92,5	7,5	-	-
17	42	F	5	10,1	34,1	68	20,3	29,7	13,7	Microcitose e hipocromia moderadas, poiquilocitose, com predomínio de micróцитos e presença de leptócitos e codócitos.	94	6	-	-
18	42	F	3,85	8,8	28	73	22,8	31,3	14,2	Microcitose e hipocromia moderadas.	97,9	2,1	-	-
19	39	F	5,36	10,5	33,9	63	19,6	31	17	Anisopoiquilocitose e hipocromia, com presença de micróцитos, macróцитos, codócitos e leptócitos.	97,8	2,2	-	-
Médias	36	-	4,1	10,8	32,5	80,4	26,8	33,1	13,0	-	94,6	3,0	44,7	-

Legenda: M = Masculino; F = Feminino; VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW = *Red Cell Distribution Width*; fL = Fentolitro; pg = Picograma; g = Grama; dL = Decilitro; L = Litro.

Nota: Valor de referência para eletroforese de hemoglobina: A: 96 a 98%; A2: 2 a 4%; Fetal: <1%; S: 0%; C: 0%.

Apesar de o sexo feminino ser predominante no grupo analisado, não significa necessariamente que seja por esse sofrer mais com anemia do que o sexo masculino, mas sim que as mulheres procuram mais pelos estabelecimentos de saúde do que os homens, de forma que, estatisticamente, há uma maior prevalência de casos de anemia nessa população. Por exemplo, neste estudo, apesar de somente 19 pessoas estarem de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, 73 aceitaram o convite de participar, sendo 60 (82,2%) do sexo feminino e 13 (17,8%) do sexo masculino.

Apesar de a análise ser realizada em pacientes anêmicos, 89% ($n = 17$) eram portadores de uma anemia discreta, com valores de hemoglobina entre 10 e 11,9 g/dL, enquanto que 2 pessoas (11%) sofriam de anemia moderada, com hemoglobinas de 8,5 g/dL e 8,8 g/dL (Gráfico 2). Quanto a classificação laboratorial do tipo de anemia, análise feita com base nos índices hematimétrico, 58% ($n = 11$) era do tipo Normocítica e Normocrômica, 42% ($n = 8$) Microcítica e Hipocrômica e nenhuma Macroscítica (Gráfico 3). Observando a Tabela 6, pode-se notar que os pacientes que apresentaram anemia Normocítica e Normocrômica apresentaram redução não somente da hemoglobina, mas também da contagem de hemácias e do hematócrito, de forma que os índices hematimétricos se mantêm normais, já que são calculados com base nessas três medições. Isso pode indicar uma causa fisiológica da anemia, como perda de sangue pela menstruação, em mulheres, ou outros motivos, onde seria necessária uma avaliação do histórico do paciente, fato que não era objeto deste estudo.

Gráfico 2 - Grau de anemia dos pacientes analisados

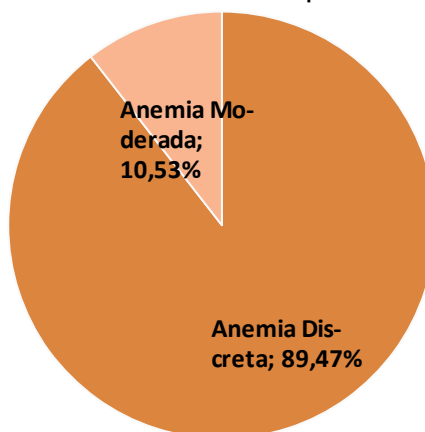
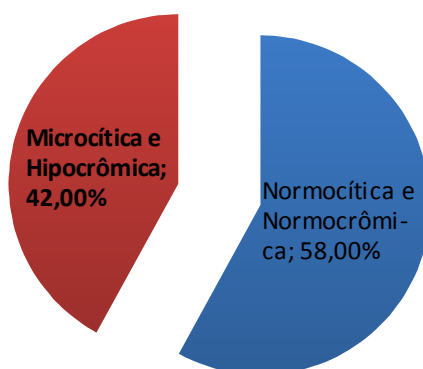
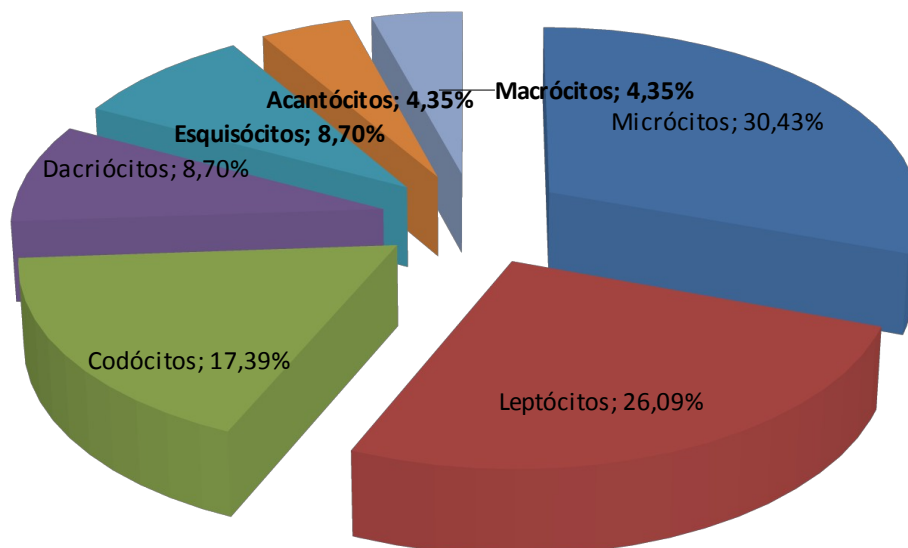


Gráfico 3 - Tipo de anemia identificada conforme classificação laboratorial pelos índices hematimétricos



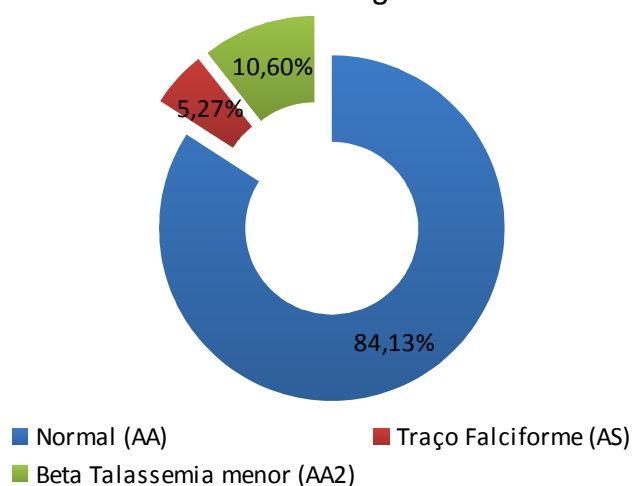
Quanto à análise da morfologia eritrocitária, 12 das 19 amostras (63,1%) apresentaram normocitose, confirmando, em sua maioria, os dados dos índices hematimétricos, enquanto que 5 delas apresentaram poiquilocitose (26,3%) e as demais apresentaram ao menos uma alteração de forma das hemácias. As principais alterações encontradas foram de micrócitos (31%, $n = 7$), leptócitos (26%, $n = 6$), codócitos (17%, $n = 4$), dacriócitos (9%, $n = 2$), esquisócitos (9%, $n = 2$), acantócitos (4%, $n = 1$) e macrócitos (4%, $n = 1$) (Gráfico 4). Algumas alterações discretas foram observadas mesmo em pacientes com os índices hematimétricos normais, como os casos de hipocromia discreta. Já as alterações mais variadas, como as poiquilocitoses, foram encontradas em uma paciente que sofria de anemia moderada, nas pacientes com beta talassemia menor ($n = 2$) e em dois pacientes que sofriam de anemia discreta, do tipo microcítica e hipocrômica.

Gráfico 4 - Principais alterações morfológicas identificadas



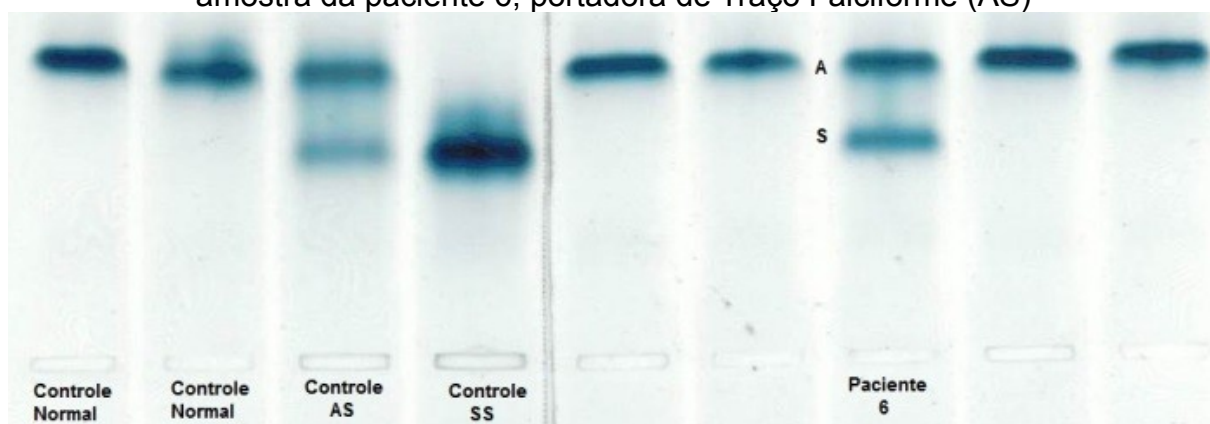
Quanto ao perfil eletroforético dos pacientes, 16 (84,1%) apresentaram eletroforese de hemoglobina normal, com dosagens de Hb A média de 97,3% e A2 de 2,7%. 3 pacientes (16%) apresentaram alguma alteração no fenótipo da hemoglobina, seja pela presença de uma hemoglobina variante ou por alteração na produção. Conforme observado na Tabela 6, a paciente nº 6 apresentou fenótipo AS (5,3%, $n = 1$), considerado traço falciforme, e as pacientes 16 e 17 apresentaram hemoglobina A2 aumentada (10,6%, $n = 2$), compatível com uma beta talassemia menor (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Perfil eletroforético de hemoglobina das amostras analisadas



O fenótipo AS foi identificado em uma paciente do sexo feminino, 18 anos, cuja eletroforese foi confirmada com o teste de falcização. O eritrograma apresentou anemia discreta, normocítica e normocrômica, sem presença de drepanócitos ou outras alterações na morfologia eritrocitária. Apesar de possuir o gene que produz a hemoglobina S, por estar em heterozigose não provoca a falcização das hemácias, de forma que a sua anemia não foi causada pela presença dessa hemoglobina variante. A Figura 22 mostra o gel da corrida, onde é possível comparar a amostra desta paciente com os controles Normal, AS e SS, bem como o gráfico da leitura densitométrica possibilita visualizar a diferença quantitativa entre as bandas A e S.

Figura 22 - Corrida eletroforética com amostras controles normal (AA), AS e SS e amostra da paciente 6, portadora de Traço Falciforme (AS)



A presença de hemoglobina A2 aumentada foi identificada em duas pacientes do sexo feminino, com idades de 22 (paciente 16) e 42 anos (paciente 17), cujas dosagens de hemoglobina A2 foram de 7,5% e 6%, respectivamente. A eletroforese qualitativa acusou a presença de uma pequena porcentagem de hemoglobina fetal, porém, o equipamento não foi capaz de dosá-la. De acordo com Naoum, P. C. e Naoum, F. A. (2008), Naoum, P. C. (2012) e Silva, Hashimoto e Alves (2009), a presença dessas hemoglobinas juntamente com as alterações na morfologia eritrocitária, a contagem de eritrócitos próxima ao limite superior do valor de referência para a idade e sexo destas pacientes e os índices hematimétricos acusando uma anemia microcítica e hipocrômica são achados que permitem concluir serem portadoras de uma Beta Talassemia (vide Quadros 1 e 2). Como a anemia é discreta (dosagem de hemoglobina 10,5 g/dL e 10,1 g/dL, respectivamente), a dosagem de A2 está menor que 10%, a Fetal em quantidades muito baixas e a Hb A com mais de 90%, conclui-se que seja uma Beta Talassemia Menor (NAOUM, P. C., 2012; SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009).

A Figura 23 mostra o gel com a corrida destas pacientes em destaque, sendo possível observar a presença das hemoglobinas supracitadas. Além disso, a paciente 17 (vide Tabela 6) relatou já ser diagnosticada com a patologia e que possuía uma filha também diagnosticada com a doença, mas que não participou deste estudo. Este relato permitiu uma comparação mais precisa com a amostra da paciente 16, que desconhecia o problema. A Figuras 24 mostra os respectivos gráficos da corrida das pacientes 16 e 17.

Figura 23 - Corrida eletroforética constando as amostras das pacientes 16 e 17, portadoras de Beta Talasemia Menor, com bandas de A2 aumentada e presença de hemoglobina Fetal

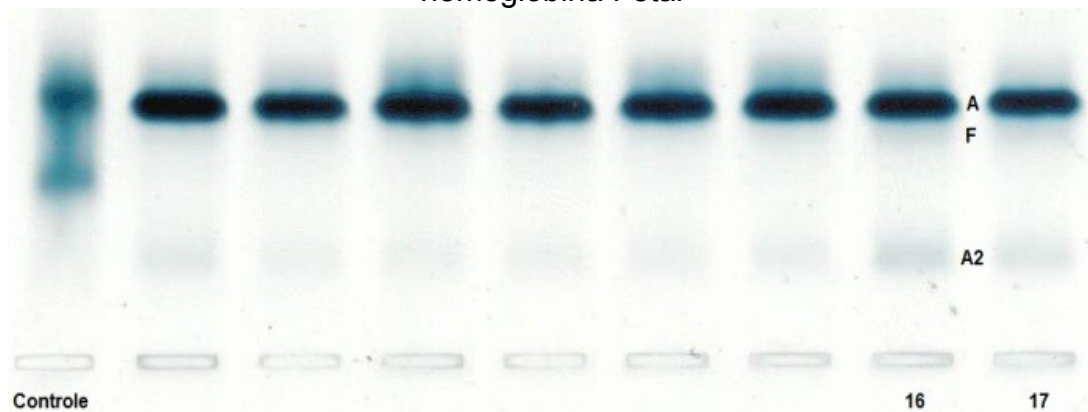


Figura 24 - Gráficos da leitura das amostras das pacientes 16 e 17, com a dosagem de hemoglobina A2 acima do valor de referência



Já a paciente 19 apresenta características no eritrograma semelhantes ao das pacientes 16 e 17, porém, sem apresentar alterações na eletroforese de hemoglobina. A diferença entre os eritrogramas está na presença de macrócitos que, juntamente com as demais alterações de forma e tamanho (micrócitos), justificam a elevação do RDW. A paciente informara que sempre sofreu de anemia, de forma que se suspeita que a presença dos macrócitos se deva a uma carência das reservas de vitamina B12 e/ou ácido fólico em virtude de uma elevada produção de eritrócitos (contagem de eritrócitos próximo ao limite superior mesmo com os índices hematimétricos indicando anemia microcítica e hipocrômica), de modo que as hemácias são liberadas na corrente sanguínea com seu volume corpuscular elevado

(NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A., 2008; SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009). Porém, essa não seria a causa da anemia, de modo que seria necessário descobrir a doença de base que esteja provocando esta anemia. Esta doença ainda pode ser uma hemoglobinopatia, pois, segundo Naoum, P.C. (2012), as talassemias do tipo beta apresentam alterações heterogêneas e formas atípicas podem ser encontradas quando há interações que modificam o resultado da eletroforese, como uma talassemia beta e alfa ou beta e delta juntas, de forma que a hemoglobina A2 mostra-se normal ou reduzida. De toda forma, seria necessária uma avaliação mais criteriosa sobre a paciente, averiguando-se o histórico clínico e a realização de outros exames para se identificar a causa base da anemia, como uma avaliação nutricional através de testes bioquímicos, como as dosagens de ferro sérico, ferritina, índice de saturação da transferrina; dosagem de bilirrubina (total, indireta e direta) para avaliação de hemólise; uma análise dos genes produtores de cadeias globínicas por métodos de biologia molecular, a fim de se identificar uma hemoglobinopatia; caso necessário uma análise da medula óssea, para se avaliar a produção dos componentes celulares do sangue ou, então, testes que avaliam a ação inflamatória (proteína C-reativa, velocidade de hemossedimentação, dosagem de citocinas) para se investigar uma possível doença crônica (CANÇADO; CHIATTONE, 2002; NAOUM, P. C., 2012). A avaliação é complexa e os exames a serem realizados devem ser solicitados conforme os resultados são obtidos, a fim de se identificar ou descartar a causa da anemia, seja por uma hemoglobinopatia, deficiência nutricional, por doença crônica ou por uma combinação de fatores.

6 CONCLUSÃO

As alterações no fenótipo das hemoglobinas, quando não detectadas pelo teste do pezinho ou nas suas formas silenciosa ou mínima, passam despercebidas pelas pessoas, que só ganham conhecimento ou por trabalhos de pesquisa envolvendo a população ou quando um descendente nasce portando uma forma mais grave.

Neste estudo, constatou-se que a prevalência das alterações no perfil eletroforético de hemoglobina em pacientes anêmicos encontra-se em 15,9%, sendo a alteração por deficiência da produção da hemoglobina a mais presente, compondo 10,6% dos casos analisados, e as hemoglobinas variantes em menor quantidade, sendo 5,3% dos casos. Apesar do baixo número de amostras e de alterações encontradas, os resultados confirmam os trabalhos realizados por Orlando et al. (2000) e Wagner et al. (2005), que constataram as talassemias como alterações mais prevalentes que as hemoglobinas variantes.

Com relação às hemoglobinas variantes, não foi possível estabelecer uma relação entre a instauração de uma anemia e a presença dessas hemoglobinas quando em heterozigose, pois a produção dessas hemoglobinas anormais juntamente com hemoglobina normal não é suficiente para causar uma anemia.

Já no caso das talassemias pode-se observar uma relação do quadro de anemia com as alterações no perfil eletroforético. Porém, somente a constatação da anemia pela dosagem de hemoglobina não é parâmetro suficiente para desconfiar sobre a presença dessa patologia. Deve-se ficar atento ao histórico do paciente de anemia recorrente, aos dados do hemograma, como contagem de eritrócitos elevadas, índices hematimétricos reduzidos e às alterações da morfologia eritrocitária, bem como descartar outras causas de anemia microcítica e hipocrômica, como a deficiência de ferro.

Visto que a faixa etária do grupo analisado era bem heterogênea, não se estabeleceu um padrão entre alteração da hemoglobina e a faixa etária de seus portadores. Quanto ao gênero, todas as alterações foram encontradas em pacientes do sexo feminino, fato que se deve a este público procurar mais os serviços de saúde do que o sexo masculino.

A eletroforese de hemoglobina se mostrou uma técnica de grande valia para este estudo, pois independente da condição de saúde em que o indivíduo se encontre ela permite identificar os diferentes fenótipos da hemoglobina na

população. Porém, ela não deve ser analisada única e exclusivamente, sendo importante a realização de outros exames para se concluir um diagnóstico.

Ressalta-se a grande importância em cada indivíduo saber se é portador de alguma alteração no fenótipo da hemoglobina, seja ela de tipo (S, C, etc.) ou por deficiência de produção (talassemias menor, média ou maior), pois mesmo que não tenha sua saúde comprometida por essa herança, ela pode ser transferida aos descendentes e estes podem acabar portando a forma patológica (homozigose), sofrendo as consequências até o final da vida.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, Simone Pôssas. **Incidência da anemia falciforme em três comunidades negras rurais do Estado do Tocantins – Brasil**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente) – Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2012. Disponível em: <<http://download.uft.edu.br/?d=788b2a0c-bd9c-4e34-a4ba-9d6f4a83b6e9:A%20INCID%20C3%8ANCIA%20DA%20ANEMIA%20FALCIFORME%20EM%20TR%20C3%8AS%20COMUNIDADES%20NEGRAS%20RURAI%20DO%20ESTADO%20DO%20TOCANTINS-BRASIL.pdf>>. Acesso em: 30 out. 2014.

ARAUJO, Maria Cristina Pignataro Emerenciano de et al. Prevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, fev. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2004000100027&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 06 set. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2004000100027>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria GM/MS n.º 822, de 06 de junho de 2001**. Institui, no âmbito do Sistema Único de Saúde, o Programa Nacional de Triagem Neonatal / PNTN. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2001/GM/GM-822.htm>>. Acesso em: 09 nov. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Nota técnica**: inserção da eletroforese de hemoglobina nos exames pré-natal – Rede Cegonha. [Brasília], 2013. 5 p. Disponível em: <http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/documentos/nt_eletroforese_hemoglobina_prenatal.pdf>. Acesso em: 03 nov. 2014.

CANÇADO, Rodolfo D.; CHIATTONE, Carlos S. Anemia de Doença Crônica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 24, n. 2, abr. 2002. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842002000200009&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 26 nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842002000200009>.

CELM – Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos. **Hemoglobina alcalina**. Barueri: CELM, 2005. Bula de procedimento técnico.

DAVID, Diego Bittencourt. **O papel do 2,3-DPG no metabolismo das hemácias**. 2009. Seminário apresentado como requisito parcial para aprovação na Disciplina Bioquímica do Tecido Animal, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [s. l.]. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/2,3dpg.pdf>>. Acesso em: 02 nov. 2014.

DCL – Distribuição Cultural do Livro. **Hematologia**. São Paulo: DCL, 2012. 288 p.

GLOBIN GENE SERVER. **Hb Var**: a database of human hemoglobin variants and thalassemias. Disponível em: <<http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>>. Acesso em: 02 nov. 2015.

GUYTON, Arthur C.; HALL, John E. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 1151 p.

KIMURA, Elza M. et al. Identificação e caracterização de variantes novas e raras da hemoglobina humana. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 30, n. 4, ago. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842008000400016&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 08 set. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842008000400016>.

LEONELI, Guilherme G. et al. Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnóstica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 22, n. 3, dez. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842000000300006&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 03 nov. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842000000300006>.

MORAES, Karen C. M.; GALIOTI, Joze B. A doença falciforme: um estudo genético-populacional a partir de doadores de sangue em São José dos Campos, São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, v. 32, n. 4, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842010000400004&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 07 set. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842010005000084>.

MURAO, Mitiko; FERRAZ, Maria Helena C. Traço falciforme: heterozigose para hemoglobina S. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, set. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000300006&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 07 set. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842007000300006>.

NAOUM, Paulo César. **Eletroforeses**: hemoglobinopatias, proteínas séricas, lipoproteínas e DNA. São Paulo: Santos, 2012. 303 p.

NAOUM, Paulo César et al. Hemoglobinas anormais no Brasil: prevalência e distribuição geográfica. **Rev. Bras. Patol. Clín.**, [S. l.], v. 23, n. 3, mai. 1987. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&nextAction=lnk&base=LILACS&exprSearch=41781&indexSearch=ID&lang=p>>. Acesso em: 09 nov. 2014.

NAOUM, Paulo César; NAOUM, Flávio Augusto. **Hematologia laboratorial**: eritrócitos. 2. ed. São José do Rio Preto: Academia de Ciência e Tecnologia, 2008. 111 p.

ONDEI, Luciana de Souza. **Identificação e caracterização de variantes novas e raras da hemoglobina humana**. 2005. 154 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2005. Disponível em: <http://base.repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/92520/ondei_ls_me_sjrp.pdf?sequence=1>. Acesso em: 26 out. 2014.

ORLANDO, Giselda M. et al. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v.

22, n. 2, ago. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842000000200007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 03 nov. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842000000200007>.

PIMENTEL, Fernanda Silva. **Identificação de hemoglobinas com corrida eletroforética semelhante à da hemoglobina S no programa estadual de triagem neonatal de Minas Gerais (PETN-MG)**. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/MEDD-8E3HEM/disserta__o_fernanda_silva_pimentel.pdf?sequence=1>. Acesso em: 06 set. 2014.

RAMALHO, Antonio Sérgio; MAGNA, Luís Alberto; PAIVA-E-SILVA, Roberto Benedito de. A Portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, ago. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2003000400040&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 25 out. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2003000400040>.

SILVA, Paulo Henrique; HASHIMOTO, Yoshio; ALVES, Hemerson Bertassoni. **Hematologia laboratorial**. Rio de Janeiro: Revinter, 2009. 466 p.

SOUZA, Debora Maria da Silva. **Incidência de hemoglobinas variantes em recém-nascidos de hospital privado em Recife-PE**. 2013. 30 f. Monografia (Especialização em Hematologia e Hemoterapia Laboratorial) – Faculdade Boa Viagem, Recife, 2013. Disponível em: <<http://www.ccecursos.com.br/img/resumos/hematologia/04.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2014.

SOUZA, Lidiane Oliveira de et al. Triagem das hemoglobinas S e C e a influência das condições sociais na sua distribuição: um estudo em quatro comunidades quilombolas do Estado do Tocantins. **Saude soc.**, São Paulo, v. 22, n. 4, dez. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-12902013000400024&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 30 ago. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-12902013000400024>.

UNESP – Universidade Estadual Paulista. **Protocolo de metodologias laboratoriais clássicas para o diagnóstico de hemoglobinopatias**. São José do Rio Preto: UNESP, 2003.

VIEIRA, Regina Coeli da Silva; FERREIRA, Haroldo da Silva. Prevalência de anemia em crianças brasileiras, segundo diferentes cenários epidemiológicos. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 23, n. 3, jun. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732010000300011&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 09 Nov. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732010000300011>.

WAGNER, Sandrine C. et al. Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes em pacientes com anemia não ferropênica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 27, n. 1, mar. 2005. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842005000100010&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 14 set. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842005000100010>.

WAJCMAN, H. et al. Abnormal Hemoglobins: Laboratory Methods. **Hemoglobin**, v. 25, n. 2, p. 169-181, 2001 apud ONDEI, Luciana de Souza. **Identificação e caracterização de variantes novas e raras da hemoglobina humana**. 2005. 154 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2005. Disponível em: <http://base.repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/92520/ondei_ls_me_sjrp.pdf?sequence=1>. Acesso em: 26 out. 2014.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of World Health Organization**, WHO, v. 79, n. 8, p. 704-712, Aug. 2001. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/74911/1/vol79.no.8.704-712.pdf?ua=1>>. Acesso em: 08 set. 2014.

WHO – World Health Organization. **Iron deficiency anemia**: assessment, prevention, and control. [S. l]: World Health Organization, 2001. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/publications/en/ida_assessment_prevention_control.pdf>. Acesso em: 09 nov. 2014.

ZAGO, M. A. et al. Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population. **Hum Hered**. V. 33, n. 2, p. 125-9, 1983 apud PIMENTEL, Fernanda Silva. **Identificação de hemoglobinas com corrida eletroforética semelhante à da hemoglobina S no programa estadual de triagem neonatal de Minas Gerais (PETN-MG)**. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/MEDD-8E3HEM/disserta__o_fernanda_silva_pimentel.pdf?sequence=1>. Acesso em: 06 set. 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO N. _____

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa “**Análise do perfil eletroforético de hemoglobina em amostras de pacientes anêmicos no município de Palmas-TO**”, desenvolvida pelo Acadêmico-Pesquisador **Raul Vilares da Silva** e sob a responsabilidade do Orientador e Pesquisador **Prof. Msc. Luis Fernando Castagnino Sesti**. Esclarecemos quanto a essa pesquisa:

Objetivo: identificar o tipo de hemoglobina presente em pacientes portadores de anemia nos laboratórios de Palmas-TO.

Justificativa: este estudo permitirá identificar a frequência com que as alterações na hemoglobina estão presentes em pacientes anêmicos, visto que elas são de origem genética e que podem causar problemas de saúde em seus portadores, prejudicando a qualidade de vida destes.

Participação: sua participação é voluntária e se dará por meio da doação de amostra de sangue coletado em laboratório e autorizando aos pesquisadores a guarda e análise deste material. Sua amostra será utilizada para esta pesquisa somente se constatada dosagem de hemoglobina abaixo do valor de referência para sua idade e sexo, sendo, neste caso, realizados testes para identificação de hemoglobinas variantes.

Riscos: desconforto causado pela coleta de sangue; a possibilidade de solicitar uma nova amostra; troca na identificação ou na manipulação das amostras; falha no sigilo sobre as informações do paciente ou dos resultados da análise. **Providências para redução dos riscos:** sangue coletado por profissional capacitado para tal procedimento; armazenamento das amostras em geladeiras com temperatura controlada; criterioso método organizacional na identificação, coleta e análise das amostras; codificação das amostras e acesso restrito de todas as informações do paciente.

Benefícios: se aceitar participar, nos permitirá relacionar as alterações na hemoglobina com os pacientes anêmicos em Palmas-TO. Além disso, caso possua alteração no hemograma condizente com anemia, poderá saber se é portador ou não de algum tipo anormal de hemoglobina. Caso seja, será esclarecido e encaminhado a um hematologista, para que este melhor o acompanhe.

Disposições finais: o (a) Sr (a) tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato tanto com os pesquisadores quanto com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/CEULP pelos contatos abaixo:

Raul Vilares da Silva

Endereço: Quadra 110 Sul, Alameda 23, Nº 61
Telefone: (63) 8442-1949
E-mail: raul.vilares@gmail.com

Msc. Luís Fernando Castagnino Sesti

Endereço: Residencial Mirante - Quadra 306 Sul,
Alameda 03, Lote 15, Apto 1101, Bloco
Andorinha
Telefone: (63) 8113-2646

E-mail: luis.sesti@ceulp.edu.br

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Luterano de Palmas – CEPCEULP

Endereço: Avenida Teotônio Segurado 1501 Sul Palmas - TO CEP 77.019-900

Telefone: (63) 3219-8052

E-mail: etica@ceulp.edu.br

IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

Nome: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Sexo: M (___) F (___) Tel.: _____

Endereço: _____

Nº _____ Complemento: _____

Cidade: _____ CEP: _____

E-mail: _____

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, _____, RG _____ fui informado sobre o que os pesquisadores querem fazer e porque precisam da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Palmas, ____ de _____ de 20____.

Assinatura do participante

Assinatura do Acadêmico-Pesquisador

Assinatura do Pesquisador Responsável



Impressão do dedo polegar caso não
saiba assinar

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENORES DE 18 ANOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENORES DE 18 ANOS N. _____

Convidamos você a autorizar a participação do menor no qual é responsável do projeto de pesquisa “**Análise do perfil eletroforético de hemoglobina em amostras de pacientes anêmicos no município de Palmas-TO**”, desenvolvida pelo Acadêmico-Pesquisador **Raul Vilares da Silva** e sob a responsabilidade do Orientador e Pesquisador **Prof. Msc. Luis Fernando Castagnino Sesti**, Esclarecemos quanto a essa pesquisa:

Objetivo: identificar o tipo de hemoglobina presente em pacientes portadores de anemia nos laboratórios de Palmas-TO.

Justificativa: este estudo permitirá identificar a frequência com que as alterações na hemoglobina estão presentes em pacientes anêmicos, visto que elas são de origem genética e que podem causar problemas de saúde em seus portadores, prejudicando a qualidade de vida destes.

Participação: sua participação é voluntária e se dará por meio da doação de amostra de sangue coletado em laboratório e autorizando aos pesquisadores a guarda e análise deste material. Sua amostra será utilizada para esta pesquisa somente se constatada dosagem de hemoglobina abaixo do valor de referência para sua idade e sexo, sendo, neste caso, realizados testes para identificação de hemoglobinas variantes.

Riscos: desconforto causado pela coleta de sangue; a possibilidade de solicitar uma nova amostra; troca na identificação ou na manipulação das amostras; falha no sigilo sobre as informações do paciente ou dos resultados da análise. **Providências para redução dos riscos:** sangue coletado por profissional capacitado para tal procedimento; armazenamento das amostras em geladeiras com temperatura controlada; criterioso método organizacional na identificação, coleta e análise das amostras; codificação das amostras e acesso restrito de todas as informações do paciente.

Benefícios: se aceitar participar, nos permitirá relacionar as alterações na hemoglobina com os pacientes anêmicos em Palmas-TO. Além disso, caso possua alteração no hemograma condizente com anemia, poderá saber se é portador ou não de algum tipo anormal de hemoglobina. Caso seja, será esclarecido e encaminhado a um hematologista, para que este melhor o acompanhe.

Disposições finais: o (a) Sr (a) tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato tanto com os pesquisadores quanto com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/CEULP pelos contatos abaixo:

Raul Vilares da Silva
Endereço: Quadra 110 Sul, Alameda 23, Nº 61
Telefone: (63) 8442-1949

Msc. Luís Fernando Castagnino Sesti
Endereço: Residencial Mirante - Quadra 306 Sul,
Alameda 03, Lote 15, Apto 1101, Bloco

E-mail: raul.vilares@gmail.com

Andorinha

Telefone: (63) 8113-2646

E-mail: luis.sesti@ceulp.edu.br

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Luterano de Palmas – CEPCEULP

Endereço: Avenida Teotônio Segurado 1501 Sul Palmas - TO CEP 77.019-900

Telefone: (63) 3219-8052

E-mail: etica@ceulp.edu.br

IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

Nome: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Sexo: M () F () Tel.: _____

Endereço: _____

Nº _____ Complemento: _____

Cidade: _____ CEP: _____

E-mail: _____

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, _____, RG _____ fui informado sobre o que os pesquisadores querem fazer e porque precisam da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em autorizar a participação do menor acima identificado no projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Palmas, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do participante

Assinatura do Acadêmico-Pesquisador

Assinatura do Pesquisador Responsável



Impressão do dedo polegar caso não
saiba assinar

APÊNDICE C – TERMO DE ASSENTIMENTO PARA

TERMO DE ASSENTIMENTO PARA MENORES DE 18 ANOS – N. _____

Você está convidado para participar da pesquisa “**Análise do perfil eletroforético de hemoglobina em amostras de pacientes anêmicos no município de Palmas-TO**”. Seus pais permitiram que você participasse.

Queremos saber o tipo de hemoglobina presente em pacientes portadores de anemia nos laboratórios de Palmas-TO.

Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir.

Será coletado uma pequena quantidade de sangue do braço das crianças, para ser analisado no Laboratório Universitário de Análises Clínicas (LUAC) do CEULP/ULBRA. O procedimento é considerado seguro, mas podem acontecer algumas coisas ruins, como: desconforto causado pela coleta; a possibilidade de ter que coletar sangue novamente; do resultado sair errado por falha na identificação ou na análise do seu sangue; de algumas informações suas serem liberadas indevidamente. Para evitar que tudo isso aconteça, tomaremos como providência: que a coleta seja feita por um profissional com experiência, para diminuir ou evitar o desconforto; cuidaremos do seu sangue corretamente, guardando ele em geladeira e analisando a tempo, para não precisar de uma nova coleta; teremos organizados e critério tanto para identificar sua amostra quanto para analisá-la; seu sangue receberá um código para que outras pessoas não saibam que ele é seu, bem como todos os documentos que façam referência a você serão guardados em local de acesso restrito.

Mas há coisas boas que podem acontecer como você saber se possui algum tipo de hemoglobina anormal que possa te prejudicar a saúde e iniciar um acompanhamento médico apropriado. Além disso, estará contribuindo em nos permitir avaliar a relação que existe entre essas hemoglobinas anormais com quem sofre de anemia.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa; não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as crianças que participaram.

Se você tiver alguma dúvida, você pode nos perguntar. Eu escrevi os telefones logo abaixo.

Raul Vilares da Silva

Endereço: Quadra 110 Sul, Alameda 23, No 61

Telefone: (63) 8442-1949

E-mail: raul.vilares@gmail.com

Msc. Luís Fernando Castagnino Sesti

Endereço: Residencial Mirante - Quadra 306 Sul,
Alameda 03, Lote 15, Apto 1101, Bloco
Andorinha

Telefone: (63) 8113-2646

E-mail: luis.sesti@ceulp.edu.br

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Luterano de Palmas – CEPCEULP

Endereço: Avenida Teotônio Segurado 1501 Sul Palmas - TO CEP 77.019-900

Telefone: (63) 3219-8052

E-mail: etica@ceulp.edu.br

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

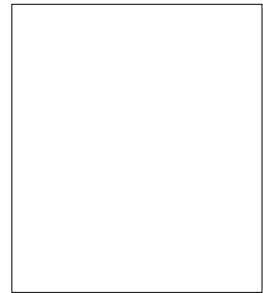
Eu _____ aceito participar da pesquisa. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir e que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Palmas, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do participante

Assinatura do Acadêmico-Pesquisador

Assinatura do Pesquisador Responsável



Impressão do dedo polegar caso não
saiba assinar

APÊNDICE D – DECLARAÇÃO DE COPARTICIPAÇÃO

DECLARAÇÃO DE COPARTICIPAÇÃO

Eu, _____, responsável pelo _____, declaro ter lido e concordo com o parecer ético emitido pelo CEP do CEULP/ULBRA, sob o nº _____, acerca com a pesquisa intitulada “**Análise do perfil eletroforético de hemoglobina em amostras de pacientes anêmicos no município de Palmas-TO**” a ser desenvolvida pelo Acadêmico-Pesquisador **Raul Vilares da Silva** e sob a responsabilidade do Orientador e Pesquisador **Prof. Msc. Luis Fernando Castagnino Sesti**; DECLARO que esta instituição consente em colaborar com a pesquisa supracitada, permitindo aos pesquisadores o contato com os pacientes que utilizam dos serviços deste laboratório para convidá-los a participarem da pesquisa supracitada, a análise dos hemogramas aqui realizados e, SOMENTE com autorização deles, será permitida a coleta de alíquota de suas respectivas amostras, no período de _____ a _____. DECLARO também que esta instituição está ciente de suas corresponsabilidades como instituição coparticipante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos participantes de pesquisa nela recrutados, dispondo de infraestrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem estar, conheço e cumprirei as Resoluções éticas Brasileiras, em especial a resolução 466/12.

Palmas, _____ de _____ de 20____.

Responsável Institucional (Carimbo)

APÊNDICE E – CARTA DEVOLUTIVA AO PACIENTE

CARTA DEVOLUTIVA

Palmas, _____ de _____ de 20_____.

Prezado(a) _____,

Agradecemos sua participação na pesquisa “**Análise do perfil eletroforético de hemoglobina em amostras de pacientes anêmicos no município de Palmas-TO**”. Os dados obtidos por meio da análise de sua amostra sanguínea serão de suma importância, pois ajudarão a dimensionar a frequência com que as alterações do tipo de hemoglobina estão presentes em portadores de anemia em Palmas-TO.

Conforme explicado durante a apresentação do Termo de Conhecimento Livre e Esclarecido – TCLE, encaminhamos a presente Carta Devolutiva com os resultados, em anexo, dos exames realizados em sua amostra de sangue. Os principais exames realizados foram o Hemograma Completo e a Eletroforese de Hemoglobina. Testes complementares foram realizados somente nos casos de alteração da Eletroforese de Hemoglobina e conforme a alteração identificada, com a finalidade de reforçar a constatação da eletroforese.

Se os resultados estiverem dentro do intervalo de referência ou de normalidade, significa que não foi detectada nenhuma forma de hemoglobinopatia. Entretanto, a dosagem de hemoglobina encontra-se abaixo do valor de referência, de forma que recomendamos que procure seu médico, a fim de que este melhor avalie sua condição.

Caso a Eletroforese de Hemoglobina tenha dado algum resultado anormal, seja no tipo de hemoglobina encontrada (presença de hemoglobina S, C ou H) ou em suas concentrações (hemoglobina A₂ e/ou Fetal elevadas), significa que é portador de uma alteração nos genes que produzem a hemoglobina.

As consequências dessas alterações variam conforme a quantidade de genes alterados. Por exemplo, se possuir um gene que produz hemoglobina normal (A) e apenas um gene que produza hemoglobina S (falciforme), seu genótipo (conjunto de genes) será considerado AS, conhecido como “Traço Falciforme”, e não possuirá

nenhuma alteração, sintomas ou problemas de saúde, tendo uma vida normal. No entanto, caso possua os dois genes para hemoglobina S (genótipo SS), será portador de uma patologia chamada “Doença Falciforme” ou “Anemia Falciforme”, que recebe este nome pelo fato das hemácias adquirirem formato de foice, causando sérios problemas de saúde, como anemia, crises dolorosas, alterações no fígado e baço e demais consequências que influenciam diretamente na qualidade de vida destes portadores. Outras variações na hemoglobina também existem, como a hemoglobina C e as Alfa-Talassemias e Beta-Talassemias, onde a presença de manifestações clínicas também dependerão da quantidade de genes alterados.

Nestes casos, recomendamos que procure um médico hematologista para que este o acompanhe e o oriente, mesmo que seja portador de uma forma assintomática, isto é, que não cause problemas de saúde, visto que essas alterações são heranças genéticas e podem ser passadas aos seus descendentes.

Novamente agradecemos pela sua participação nesta pesquisa e nos colocamos a disposição para maiores informações. Segue abaixo nossos contatos:

Raul Vilares da Silva

Endereço: Quadra 110 Sul, Alameda 23, N° 61

Telefone: (63) 8442-1949

E-mail: raul.vilares@gmail.com

Msc. Luís Fernando Castagnino Sesti

Endereço:

Telefone:

E-mail: luis.sesti@ceulp.edu.br

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Luterano de Palmas – CEPCEULP

Endereço: Avenida Teotônio Segurado 1501 Sul Palmas - TO CEP 77.019-900

Telefone: (63) 3219-8052

E-mail: etica@ceulp.edu.br

Atenciosamente,

Luis Fernando Castagnino Sesti
(Pesquisador Responsável)

Raul Vilares da Silva
(Acadêmico Pesquisador)

APÊNDICE F – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP) PARA
ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA IMPLANTADO NO LUAC

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA

1 INTRODUÇÃO

A eletroforese de hemoglobina é utilizada para o diagnóstico das hemoglobinopatias, pois, através dela, é possível identificar a presença de hemoglobinas variantes, como a S, C e H, ou quantidades anormais das hemoglobinas A, A₂ e Fetal nas talassemias.

Consiste na separação de moléculas carregadas eletricamente aplicando-se um campo elétrico sobre uma amostra (em um determinado pH), fazendo com que moléculas com carga elétrica negativa migrem para o polo positivo e moléculas com carga positivo migrem para o polo negativo.

A eletroforese de hemoglobina em pH alcalino é a mais utilizada, pois, quando a hemoglobina A (que possui ponto isoelétrico em pH 6,8) é submetida à uma faixa de pH entre 8,5 e 9,5, passa a ter carga elétrica negativa e migra para o polo positivo do campo. O mesmo acontece com os demais tipos de hemoglobina (F, A₂, S, C, H, etc.), porém, visto que possuem diferenças na constituição, migram em pontos diferentes.

No caso de diferentes hemoglobinas que migram para uma mesma posição (A₂ com C; D com S), se faz necessário realizar a eletroforese ácida. Em pH 6,2, a hemoglobina passa a ter carga positiva (exceto a C, que permanece negativa) e migra para o polo negativo e em posições diferentes da eletroforese alcalina, permitindo, assim, diferenciá-las.

2 AMOSTRA

Sangue total coleta do anticoagulante EDTA ou Heparina. A amostra é estável se armazenada a temperatura de 2 a 8 °C por 1 semana com heparina e até 2 semanas com EDTA.

3 PREPARO DO CORANTE E DESCORANTE

3.1 Solução corante com Negro de Amido

Reagentes:

- 5g de Negro de Amido 10B (ou Amido Black 10B);
- 450mL de álcool metílico;
- 50mL de ácido acético glacial;
- 450mL de água destilada ou deionizada;

Procedimento:

1. Dissolver o Negro de Amido 10B (5g) em 450mL de água destilada ou deionizada;
2. Adicionar o álcool metílico (450mL) e ácido acético (50mL) e homogeneizar.

3.3 Solução descorante

Reagentes:

- 100mL de ácido acético glacial P.A.;
- 50mL de metanol P.A.;
- Água destilada ou deionizada;
- Proveta graduada de 1000mL.

Procedimento:

1. Em uma proveta graduada de 1000mL, adicionar 100mL de ácido acético glacial P.A e 50mL de Metanol P.A;
2. Completar o volume com água destilada ou deionizada até 1000mL.

3.4 Solução de ácido acético a 5%

Reagentes:

- 50mL de ácido acético glacial P.A.;
- 950mL de água destilada ou deionizada;

Procedimento:

1. Em uma proveta graduada de 1000mL, adicionar 950mL de água deionizada ou destilada e 50mL de ácido acético glacial P.A. Homogeneizar bem.

4 PREPARO DO HEMOLISADO

4.1 Lavagem das hemácias

1. Em um tubo de ensaio adicionar 500µL de sangue total e 3mL a 4mL de solução fisiológica a 0,9%;
2. Centrifugar a 3000rpm por 2 minutos;
3. Desprezar o sobrenadante;
4. Repetir o processo de 2 a 3 vezes ou até que o sobrenadante fique límpido.

4.2 Hemolisado rápido com saponina

Esse procedimento técnico é recomendável para estudo populacional, nas suspeitas de hemoglobinas instáveis e talassemias do tipo alfa. Não é aconselhável utilizá-lo para dosagens bioquímicas de hemoglobinas, especialmente de Hb Fetal.

Procedimento:

1. Preparar solução hemolisante dissolvendo 1g de Saponina P.A. em 100 mL de água destilada;

2. Em um tubo de ensaio, adicionar volumes iguais de solução hemolisante e de hemácias lavadas;
3. Agitar vigorosamente em agitador de tubos até hemólise completa;
4. Ajustar a concentração de hemoglobina do hemolisado para 1 g/dL, diluindo este com água destilada ou deionizada. Para saber o volume de água necessário para esta diluição, usar a fórmula a abaixo:

$$VD = \frac{[Hb \text{ dosada}] \times VH}{[Hb \text{ desejada}]} - VH$$

Onde:

- VD = Volume de água para diluição;
- [Hb dosada] = Concentração da hemoglobina dosada no hemograma;
- [Hb desejada] = Concentração de hemoglobina que se deseja obter (1 g/dL);
- VH = Volume do hemolisado preparado.

A estabilidade do hemolisado é de 24 horas quando armazenado entre 2 e 8°C.

5 ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA EM PH ALCALINO

O procedimento a seguir é descrito para o sistema CELM® com densitometria DS-35.

Materiais:

- Tampão Tris pH 9,5 gelado;
- Filme de agarose CELMGEL Hemoglobina Alcalina;
- Secador de cabelos com aquecimento;
- Pipeta de 0,5µL ou 1µL;
- Vasilhas de fundo plano para corante e descorante;
- Solução corante com negro de amido 10B;
- Solução descorante;
- Ácido acético a 5,0%.

Procedimento:

1. Colocar 100mL de tampão Tris pH 9,5 GELADO na cuba;
2. Aplicar 0,5µL a 1µL de cada hemolisado no filme de gel alcalino;
3. Colocar o filme no porta-filme coincidindo os pólos negativos do filme com a cuba;
4. Colocar o porta-filme na cuba e tampá-la. **Deixar por 20 minutos a 150V;**
5. Retirar a tampa e o porta-filme da cuba, colocando-a sobre uma folha de papel de filtro para eliminar o excesso de tampão das bordas do filme;
6. Retirar o filme do porta-filme;
7. Secar completamente o filme a 60°C (55°C - 65°C). Sugere-se o uso de secador de cabelos com aquecimento;

8. Mergulhar o filme no corante negro de amido por 10 minutos sem agitação;
9. Retirar o filme do corante e secá-lo a 60°C (55°C - 65°C). Sugere-se o uso de secador de cabelos com aquecimento;
10. Mergulhar o filme na solução descorante por 10 minutos (pré-descoloração);
11. Repetir o procedimento acima com descorante limpo por 10 minutos;
12. Completar a descoloração deixando o filme mergulhado por 10 minutos ou até sua total descoloração em ácido acético 5%;
13. Secar completamente o filme a 60°C (55°C - 65°C). Sugerimos o uso de secador de cabelos com aquecimento;
14. Efetuar a leitura no densitômetro DS-35 em comprimento de onda de 420nm.

Valores de referência (após 1 ano de idade):

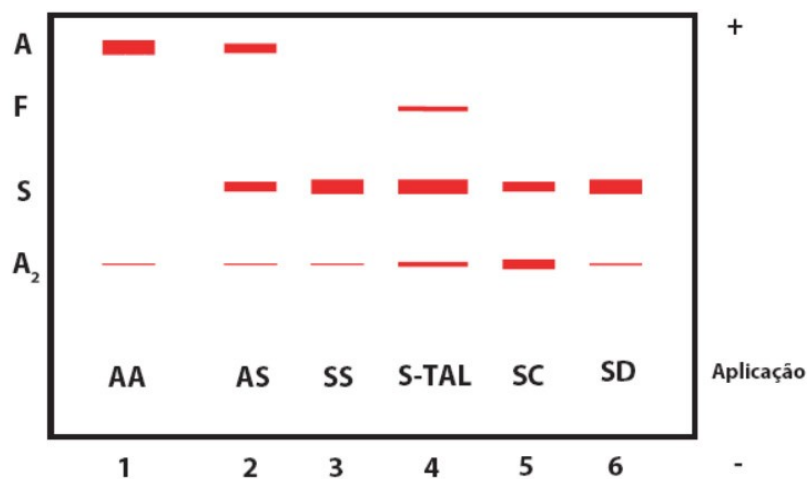
A = 96,0 a 98,0%.

A₂ = 2,0 a 4,0%.

Fetal = <1,0%.

Interpretação: as imagens a seguir servem como mapa para interpretação qualitativa.

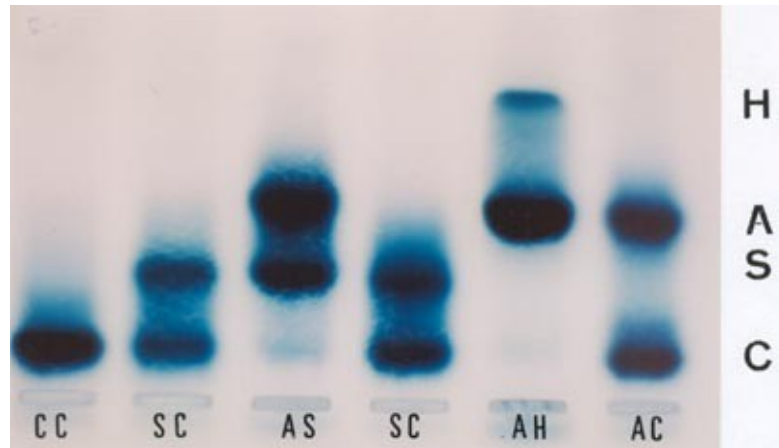
Figura 1 - Esquema de representação das posições das diferentes hemoglobinas no gel de eletroforese em pH alcalino



Fonte:

http://www.medicinanet.com.br/conteudos/biblioteca/2270/2_confirmacao_diagnostica.htm

Figura 2 - Análise eletroforética de hemoglobina em pH alcalino de diferentes genótipos



Fonte: <http://www.hemoglobinopatias.com.br/hemoglobinopatias/analises.htm>

6 ELETROFORESE EM PH ÁCIDO

Materiais:

- Tampão Fosfato pH 6,2;
- 500mg de Ágar-agar;
- Pipeta Volumétrica;
- Lâmina de microscópio;
- Papel de filtro;
- Aplicador de amostra ou lamínula.

Preparo do ágar-fosfato:

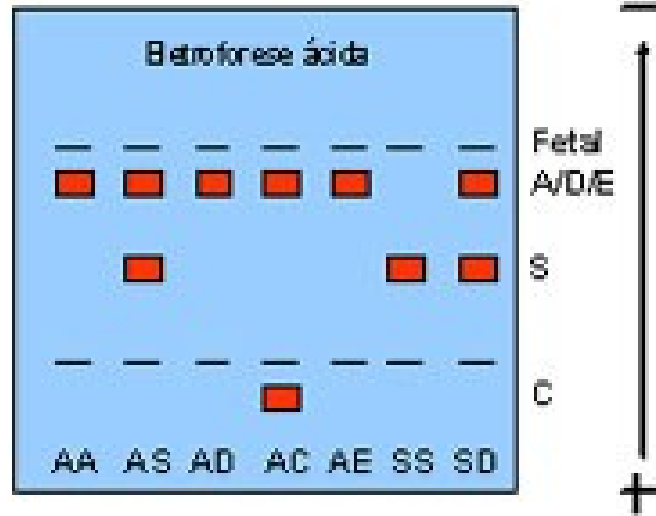
1. Em um erlenmeyer adicionar 500 mg de ágar-ágar e 25 mL de tampão fosfato pH 6,2 e aquecer até completa dissolução;
2. Pipetar 3,5 mL do gel em cada lâmina de microscópio. Deixar polimerizar a temperatura ambiente.

Procedimento da eletroforese em pH ácido:

1. Adicionar 100mL de tampão fosfato pH 6,2 na cuba de eletroforese;
2. Aplicar o hemolisado na porção média da lâmina, inserindo o aplicador (pode-se utilizar uma lamínula no lugar do aplicador) com cuidado para não partir totalmente o gel;
3. Para conexão do gel com os compartimentos eletrolíticos usar folha dupla de papel de filtro; Aplicar 50V por 30 minutos;
4. Analisar inicialmente sem corar;
5. Para melhor interpretação das frações corar com Negro de Amido.

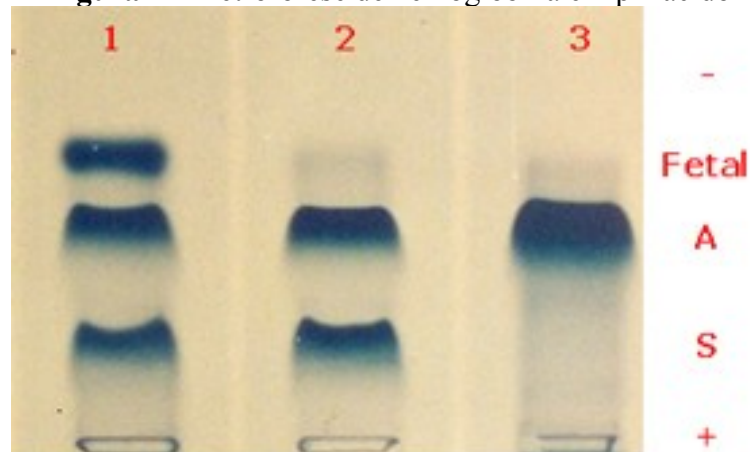
Interpretação: as imagens a seguir servem como mapa para interpretação qualitativa.

Figura 3 - Esquema das posições das hemoglobinas em eletroforese de pH ácido



Fonte: <http://www.hemoglobinopatias.com.br/dialab/dialab-index.htm>

Figura 4 - Eletroforese de hemoglobina em pH ácido



Fonte: <http://www.hemoglobinopatias.com.br/d-falciforme/diagnostico.htm>

REFERÊNCIAS

CELM – Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos. **Hemoglobina alcalina**. Barueri: CELM, 2005. Bula de procedimento técnico.

NAOUM, Paulo César. **Eletroforeses: hemoglobinopatias, proteínas séricas, lipoproteínas e DNA**. São Paulo: Santos, 2012. 303 p.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP. **Protocolos de metodologias laboratoriais clássicas para o diagnóstico de hemoglobinopatias**. Disponível em: <<http://www.lhgdh.locaweb.com.br/protocolos/metodologias.pdf>>. Acesso em: 07 jun. 2015.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CEULP/ULBRA

CENTRO UNIVERSITÁRIO
LUTERANO DE PALMAS -
ULBRA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DE HEMOGLOBINA EM AMOSTRAS DE PACIENTES ANÊMICOS

Pesquisador: Luís Fernando Castagnino Sesti

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 41807015.2.0000.5516

Instituição Proponente: Centro Universitário Luterano de Palmas - ULBRA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.257.021

Apresentação do Projeto:

Tema: análise do perfil eletroforético de hemoglobina em amostras de pacientes anêmicos no município de Palmas/TO.

Projeto de pesquisa apresentado como requisito parcial para aprovação na disciplina de Pesquisa em Ciências Biomédicas do curso de Biomedicina pelo Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Problema de Pesquisa

Qual o perfil eletroforético da hemoglobina nas amostras de pacientes anêmicos que chegam aos laboratórios de Palmas-TO?

Hipóteses

Acredita-se que a maioria dos pacientes apresentarão genótipo de hemoglobina normal e que apenas uma pequena parcela possuirá alterações no padrão.

Objetivo Primário: Identificar o perfil eletroforético de hemoglobina nas amostras de pacientes anêmicos que chegam aos laboratórios de Palmas-TO. Prisional de Palmas/ TO.

Objetivos Secundários:

- Implantar o Procedimento Operacional Padrão (POP) para eletroforese de hemoglobina no Laboratório Universitário de Análises Clínicas (LUAC) do Centro Universitário Luterano de Palmas

Endereço: Av. Teotônio Segurado, 1501 Sul Prédio 5 Sala 541

Bairro: Plano Diretor Sul

CEP: 77.054-970

UF: TO

Município: PALMAS

Telefone: (63)3219-8076

Fax: (63)3219-8005

E-mail: etica@ceulp.edu.br

CENTRO UNIVERSITÁRIO
LUTERANO DE PALMAS -
ULBRA



Continuação do Parecer: 1.257.021

(CEULP/ULBRA);

- Analisar as amostras de pacientes anêmicos utilizando-se a técnica da eletroforese de hemoglobina e testes complementares, quando necessários;
- Identificar a prevalência com que as hemoglobinas variantes se apresentam entre os portadores de anemia e correlacionar com a idade e sexo destes indivíduos.

Desenho do Estudo

Este projeto é de finalidade aplicada, com abordagem quali-quantitativa, cujo objetivo metodológico possui caráter exploratório, tendo como procedimento uma análise experimental a ser realizado em laboratório.

Universo e Amostragem

A amostra será composta por 200 alíquotas das amostras de sangue de quatro laboratórios (um Plano Diretor Norte, dois no Plano Diretor Sul e um em Taquaralto).

Critérios de Inclusão

- Amostras de sangue que possuam dosagem de hemoglobina abaixo do valor de referência para o sexo e a idade do paciente e que seja possível alíquota o volume mínimo de 1 mL e deixar reserva no tubo primário para o laboratório (salvaguardando os casos em que o laboratório não demonstrar interesse em armazenar o conteúdo o tubo primário).

Exclusão:

- Amostras de pacientes que não autorizaram seu uso por meio do TCLE, de pacientes gestantes;
- Amostras que foram coletadas sem anticoagulante EDTA, que apresentem coágulos, hemólise ou que estiveram congeladas;
- Amostras de pacientes que possuam idade menor ou igual a 1 (um) ano serão desconsideradas.

Local e Período de Realização do Estudo:

- As amostras serão analisadas no LUAC do CEULP/ULBRA, onde, no período de agosto a setembro de 2015, realizar-se-á a implantação da metodologia da eletroforese de hemoglobina. Posteriormente, entre setembro e novembro de 2015, a coleta e análise das alíquotas.

Variáveis

- As variáveis estudadas serão os tipos de hemoglobina presentes na análise eletroforética, o percentual de cada uma por amostra e a frequência com que se apresentarão dentro do total de amostras. Secundariamente, esses dados primários serão correlacionados com as variáveis sexo e idade dos pacientes. Dados complementares alguns valores do hemograma, sendo eles: contagem de eritrócitos, descrição da morfologia eritrocitária, dosagem de hemoglobina, hematócrito, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), e o índice que avalia a

Endereço: Av. Teotônio Segurado, 1501 Sul Prédio 5 Sala 541

Bairro: Plano Diretor Sul

CEP: 77.054-970

UF: TO

Município: PALMAS

Telefone: (63)3219-8076

Fax: (63)3219-8005

E-mail: etica@ceulp.edu.br

CENTRO UNIVERSITÁRIO LUTERANO DE PALMAS - ULBRA



Continuação do Parecer: 1.257.021

diferença de tamanho entre as hemácias, o Red Cell Distribution Width (RDW).

Desfechos

- Primário: [informado pelos autores] "O conhecimento produzido por essa pesquisa permitirá dimensionar a frequência com que as variações fenotípicas da hemoglobina se apresentam nos pacientes anêmicos do município de Palmas/TO e com que frequência elas entram na rotina dos laboratórios de análises clínicas, bem como identificar qual variação encontra-se mais presente."

- Secundário: [informado pelos autores] "Essa pesquisa ajudará a identificar também qual o tipo de paciente anêmico que aparece com maior frequência na rotina laboratorial e portador dessa alteração hereditária com base nos parâmetros de sexo e idade. Além disso, relacionando com as informações complementares do hemograma, será possível descrever as alterações hematológicas presentes conforme o perfil e compará-las com os estudos bibliográficos."

"Possuirá como desfecho, também, as técnicas de eletroforese de hemoglobina em pH alcalino e ácido procedimentalizadas no LUAC do CEULP/ULBRA, permitindo, assim, que sejam utilizadas tanto para as atividades de estágio dos cursos de biomedicina e farmácia quanto para outros projetos de pesquisa e/ou extensão posteriores."

Instrumentos, Procedimento de coleta (dividido em quatro etapas de execução) e - Estratégia de análise:

- 1ª Etapa: Implantação da técnica de eletroforese de hemoglobina no LUAC do CEULP/ULBRA, onde serão definidos a forma de preparação do hemolisado, o maquinário necessário, o material do gel, o pH das soluções tampão alcalino e ácido, a tensão a ser empregada, tempo da corrida e o método para quantificação das hemoglobinas presentes no gel.

- 2ª Etapa: Ocorrerá com a colaboração dos laboratórios que aceitarem em auxiliar na pesquisa e assinarem a Declaração de Coparticipação (Apêndice C), permitindo o contato com os pacientes no ato da coleta para solicitá-los autorização, por meio do TCLE, do uso de uma alíquota de sua amostra sanguínea para os fins a que se destina esse projeto de pesquisa. O hemograma das amostras será realizado no laboratório em que foram coletadas e serão adquiridas alíquotas daquelas cuja dosagem de hemoglobina estiver abaixo do valor de referência para o sexo e idade do paciente.

- 3ª Etapa: Processar as alíquotas através do procedimento implantado na 1ª Etapa, realizando a análise quali-quantitativa das hemoglobinas (tipo de hemoglobina presente e o percentual com que se encontra em cada alíquota). Caso necessário, testes complementares serão realizados. Esse processamento deverá ocorrer, preferencialmente, no mesmo dia em que se obterem as alíquotas ou, no máximo, no dia subsequente.

Endereço: Av. Teotônio Segurado, 1501 Sul Prédio 5 Sala 541

Bairro: Plano Diretor Sul

CEP: 77.054-970

UF: TO

Município: PALMAS

Telefone: (63)3219-8076

Fax: (63)3219-8005

E-mail: etica@ceulp.edu.br

CENTRO UNIVERSITÁRIO
LUTERANO DE PALMAS -
ULBRA



Continuação do Parecer: 1.257.021

- 4ª Etapa: Compilação e análise dos dados obtidos, utilizando o programa Microsoft Excel versão 2010, para tabulação das variáveis e resultados. Os resultados serão apresentados no formato de gráficos e/ou tabelas e discutidos com base na literatura.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

- Identificar o perfil eletroforético de hemoglobina nas amostras de pacientes anêmicos que chegam aos laboratórios de Palmas/TO.

Objetivos Específicos

- Implantar o Procedimento Operacional Padrão (POP) para eletroforese de hemoglobina no Laboratório Universitário de Análises Clínicas (LUAC) do Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA);
- Analisar as amostras de pacientes anêmicos utilizando-se a técnica da eletroforese de hemoglobina e testes complementares, quando necessários;
- Identificar a prevalência com que as hemoglobinas variantes se apresentam entre os portadores de anemia e correlacionar com a idade e sexo destes indivíduos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: [informado pelos autores]:

Os possíveis riscos previstos para essa pesquisa são:

- Desconforto causado ao sujeito da pesquisa em decorrência da coleta de sangue (punção venosa);
- Possibilidade de solicitar uma nova amostra, seja por algum problema na coleta, transporte ou armazenamento da amostra, causando novamente o desconforto da punção venosa;
- Troca da identificação ou na manipulação da aliquota de dois pacientes anêmicos ou entre um paciente anêmico e outro não, o que pode proporcionar resultados com diagnósticos diferentes entre si, como falso-positivo ou falso-negativo;
- Falha no sigilo sobre as informações dos pacientes e/ou da identificação do laboratório, podendo causar prejuízos social e/ou moral;
- Risco aos pesquisadores e quaisquer outras pessoas envolvidas na manipulação, transporte e acondicionamento das amostras, em virtude do desconhecimento sobre a presença de agentes infecciosos nas mesmas.

A fim de reduzir os possíveis riscos, serão adotadas as seguintes medidas:

- A coleta de sangue será realizada por profissional capacitado e habilitado para tal procedimento;
- A amostra será transportada seguindo o disposto na RDC 20, de 10 de abril de 2014, a fim de

Endereço: Av. Teotônio Segurado, 1501 Sul Prédio 5 Sala 541

Bairro: Plano Diretor Sul

CEP: 77.054-970

UF: TO

Município: PALMAS

Telefone: (63)3219-8076

Fax: (63)3219-8005

E-mail: etica@ceulp.edu.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO
LUTERANO DE PALMAS -
ULBRA**



Continuação do Parecer: 1.257.021

manter a estabilidade da mesma durante o transporte e garantindo a segurança de quem a transporta;

- Todas as amostras obtidas serão armazenadas no LUAC, em geladeiras com temperatura controlada de 2 a 8oC, sendo devidamente identificadas;
- A manipulação das amostras em qualquer momento da pesquisa se dará sempre com o uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI's) e ocorrerá seguindo as Boas Práticas para o Laboratório Clínico (BPLC);
- Será implantado criterioso método organizacional tanto na fase pré-analítica (identificação e coleta das alíquotas) quanto na fase analítica (análise das alíquotas), com a finalidade de evitar quaisquer erros durante a manipulação das amostras;
- Com o objetivo de amenizar os riscos sobre as informações dos pacientes e laboratórios, além do procedimento de codificação das amostras, todos os documentos referentes aos mesmos serão guardados em local de acesso restrito, podendo manuseá-los somente o acadêmico pesquisador, o co-orientador e o orientador/pesquisador deste projeto.

Benefícios: [informado pelos autores]

Essa pesquisa dará ao sujeito da pesquisa a oportunidade de saber se é portador ou não de algum tipo anormal de hemoglobina ou de uma talassemia, sendo esclarecido quanto ao fato e encaminhado a um hematologista, caso necessário, para que este melhor o acompanhe.

Além disso, a obtenção do perfil fenotípico da hemoglobina em amostras laboratoriais de pacientes anêmicos do município de Palmas/TO permitirá dimensionar o quanto essa alteração aparece como causa dessa doença bem como a frequência com que chega à rotina laboratorial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- Sabendo-se que a alteração do fenótipo normal da hemoglobina possui origem genética e que é considerado um problema de saúde pública devido à gravidade que essa alteração pode gerar na vida do paciente por toda sua vida, a pesquisa tem relevância pois permitirá dimensionar a frequência com que essas variações se apresentam nos pacientes anêmicos do município de Palmas/TO, bem como identificar qual tipo encontra-se mais presente.
- Além disso, a implantação da metodologia de eletroforese de hemoglobina no LUAC do CEULP/ULBRA permitirá para os acadêmicos dos cursos de Biomedicina e Farmácia não só o contato com mais uma técnica diagnóstica, mas também a possibilidade de realização de projetos de extensão ou outros trabalhos de pesquisa na área de hematologia.
- O protocolo, em geral, apresenta de modo organizado. Como se trata de um projeto de pesquisa para Trabalho de Conclusão de Curso entende-se que o protocolo atende a Resolução 466/12

Endereço: Av. Teotônio Segurado, 1501 Sul Prédio 5 Sala 541
 Bairro: Plano Diretor Sul CEP: 77.054-970
 UF: TO Município: PALMAS
 Telefone: (63)3219-8076 Fax: (63)3219-8005 E-mail: etica@ceulp.edu.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO
LUTERANO DE PALMAS -
ULBRA**



Continuação do Parecer: 1.257.021

estando adequado para ser desenvolvido.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Folha de Rosto: atende as diretrizes éticas vigentes e foi devidamente preenchida e anexada;
- Declaração de Compromisso do Pesquisador Responsável (Termo de responsabilidade do pesquisador) – atende as diretrizes éticas vigentes e foi devidamente preenchida e anexada aos documentos obrigatórios da Plataforma Brasil;
- Instrumento (registro de dados da pesquisa) de coleta de dados proposto atende as diretrizes éticas vigentes e foi devidamente construído e anexado aos documentos obrigatórios da Plataforma Brasil;
- Cronograma – atualizado e atende a proposta da pesquisa;
- Orçamento – descrito no pré-projeto e citado os responsáveis pelo financiamento;
- Os Termos (de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE; de Assentimento Livre e Esclarecido – TALE e; Carta devolutiva ao paciente) atendem as diretrizes éticas vigentes e necessita de observações.
- Documento da Instituição Campo Autorizando o Estudo (Termo de autorização institucional) - atende as diretrizes éticas vigentes e foi devidamente preenchido e anexado aos documentos obrigatórios da Plataforma Brasil;
- O currículo dos pesquisadores atendem as exigências para esta pesquisa.

Recomendações:

- Trabalho anexado com Revisões do Word (comentários entre os pesquisadores não retirados do que foi anexado a PB).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Sem pendências

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_463012.pdf	16/09/2015 11:46:54		Aceito
Declaração de Instituição e	DeclaracaodeCoparticipacao.pdf	16/09/2015 11:46:25	Luís Fernando Castagnino Sesti	Aceito

Endereço: Av. Teotônio Segurado, 1501 Sul Prédio 5 Sala 541
 Bairro: Plano Diretor Sul CEP: 77.054-970
 UF: TO Município: PALMAS
 Telefone: (63)3219-8076 Fax: (63)3219-8005 E-mail: etica@ceulp.edu.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO
LUTERANO DE PALMAS -
ULBRA**



Continuação do Parecer: 1.257.021

Infraestrutura	DeclaracaodeCoparticipacao.pdf	16/09/2015 11:46:25	Luís Fernando Castagnino Sesti	Aceito
Outros	RegistroidadosdaPesquisa.docx	04/09/2015 10:52:38	Luís Fernando Castagnino Sesti	Aceito
Outros	ApendiceCartaDevolutiva.docx	04/09/2015 10:45:12	Luís Fernando Castagnino Sesti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ApendiceTermodeAssentimentodoMenor.docx	04/09/2015 10:41:22	Luís Fernando Castagnino Sesti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ApendiceTCLEMenordeidade.docx	04/09/2015 10:41:10	Luís Fernando Castagnino Sesti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ApendiceDTCLE.docx	04/09/2015 10:40:40	Luís Fernando Castagnino Sesti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_TCC_Raul_Final.docx	04/09/2015 10:38:23	Luís Fernando Castagnino Sesti	Aceito
Outros	Termo_de_Responsabilidade_do_Pesquisador.pdf	04/09/2015 10:36:42	Luís Fernando Castagnino Sesti	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso_de_Uso_de_Dados.pdf	04/09/2015 10:36:05	Luís Fernando Castagnino Sesti	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_Autorizacao_Institucional.pdf	04/09/2015 10:35:35	Luís Fernando Castagnino Sesti	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_463012.pdf	13/02/2015 17:34:41		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_463012.pdf	06/02/2015 17:38:44		Aceito
Folha de Rosto	Raul.JPG	06/02/2015 17:19:29		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Teotônio Segurado, 1501 Sul Prédio 5 Sala 541
 Bairro: Plano Diretor Sul CEP: 77.054-970
 UF: TO Município: PALMAS
 Telefone: (63)3219-8076 Fax: (63)3219-8005 E-mail: etica@ceulp.edu.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO
LUTERANO DE PALMAS -
ULBRA**



Continuação do Parecer: 1.257.021

PALMAS, 03 de Outubro de 2015

Assinado por:
MÁRCIA MESQUITA VIEIRA
(Coordenador)

Endereço: Av. Teotônio Segurado, 1501 Sul Prédio 5 Sala 541
Bairro: Plano Diretor Sul **CEP:** 77.054-970
UF: TO **Município:** PALMAS
Telefone: (63)3219-8076 **Fax:** (63)3219-8005 **E-mail:** etica@ceulp.edu.br