

ANEMIAS – CLASSIFICAÇÃO E DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

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

Introdução

As anemias obedecem a um padrão de análises que necessita de uma visão introdutória da hematopoiese e de valores referenciais devido à intrínseca relação de causas e efeitos dos seus diferentes tipos.

Hematopoiese e valores referenciais em hematologia são abordagens distintas, porém, extremamente ligadas no sentido do entendimento do resultado de um hemograma. Nesse contexto a avaliação se faz, sob o ponto de vista dos resultados numéricos, nas formas independentes das três séries celulares do sangue, quais sejam, a série vermelha – em que são considerados os eritrócitos e seu principal componente, a hemoglobina, a série branca – em que se avaliam os diferentes tipos de leucócitos, e a série trombocítica ou plaquetária – em que se determinam as plaquetas. A avaliação do plasma e de alguns de seus inúmeros componentes, também se reveste de grande importância, uma vez que, diante de um quadro patológico, o médico e o profissional de laboratório precisam de analisar o conjunto de informações para interpretar o resultado de um determinado exame, conforme o exemplo abaixo:

Paciente masculino adulto com hemorragia crônica e inflamação de garganta

Resultado Laboratorial

CE: 3.930.000/mm³

Ht: 29%

Hb: 8,6 g/dL

VCM: 73,7 fL

HCM: 21,8 pg

CHCM: 29,6 g/dL

Resultado que interessa ao médico

Hb: 8,6 g/dL

HCM: 21,8 pg

RDW: 15%

Morfologia: Microcitose e hipocromia

Ferro sérico: 38 ug/dL

CTLFe *: 320 ug/dL

IST **: 11,8%

Ferritina: 360 ug/dL

Leucócitos: 14.700/mm³

Plaquetas: 195.000/mm³

Morfologia: Microcitose e hipocromia

Ferro sérico: 38 ug/dL

IST: 11,8%

Ferritina: 360 ug/dL

Leucócitos: 14.700/mm³

Plaquetas: 195.000/mm³

* CTLFe: Capacidade total de ligação de ferro.

** IST: Índice de Saturação de Transferrina

Obs: Exemplo é meramente ilustrativo, inclusive em relação à opção de interesse do médico.

A pergunta que se faz é: Por que entre as 14 avaliações laboratoriais apenas oito interessaram ao médico? A resposta é simples: objetividade analítica dos resultados. Essa objetividade inclui a história clínica do paciente e resultados que realmente podem colaborar para explicar a situação, naquele momento, do paciente. A Hb: 8,6g/dL indica anemia moderada, o HCM: 21,8 g/dL (diminuído) indica que se trata por deficiência de hemoglobina, que é confirmada pela hipocromia da morfologia. Diante do fato que a maior causa de anemia no Brasil é por deficiência de ferro (no presente caso devido à perda crônica de sangue) a avaliação de ferro e índice de saturação da transferrina são fundamentais. O ferro sérico de 38 ug/dL está diminuído e o IST de 11,8% é patognomônico de anemia por deficiência de ferro. A ferritina de 360 ug/dL está elevada, e por ser um sensível marcador de fase aguda de infecção/inflamação, confirma a inflamação de garganta do paciente. A discreta leucocitose justifica a inflamação e o número normal de plaquetas mostra que, apesar do processo hemorrágico, sua atuação não está comprometida.

Para se chegar a essa forma de raciocínio é preciso conhecer muito bem a hematopoiese, e notadamente a eritropoiese, para relaciona-la com os resultados de um eritrograma.

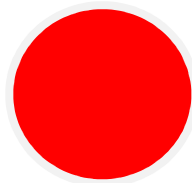
A Eritropoiese

Essa terminologia se refere exclusivamente à formação dos eritrócitos, desde a célula tronco pluripotencial primitiva, das células nucleadas intermediárias (eritroblastos), reticulócitos, eritrócitos, fatores da eritropoiese (eritropoietina ou EPO, vitamina B₁₂, ácido fólico e ferro), fatores genéticos, fatores ambientais (infecção, queimadura, etc). Portanto a eritropoiese não se refere apenas ao desenvolvimento morfológico e funcional dos eritrócitos e de seus precursores, mas também são dependentes de situações inesperadas, por exemplo: incompatibilidade materno-fetal de Rh, entre outras.

Para entender o conjunto da eritropoiese a figura abaixo resume os principais eventos do seu sucesso e insucesso.

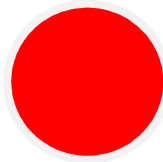
SUCESSO

DNA Normal
IL-3



Célula tronco
Pluripotencial

EPO



Célula tronco
Mielóide

Vit. B₁₂
Ac. Fólico



Proeritroblasto

Ferro



Eritroblastos
Basófilo, Poli e
Ortocromático

Ferro



Reticulócitos

120 dias de vida útil



Eritrócito

INSUCESSO

DNA Mutante: Hemoglobinopatias, e
Deficiências de Enzimas e de
proteínas de membrana

Deficiência de EPO por ex: tumor
renal.
DNA Mutante: Síndrome
mielodisplásica

Deficiência de vit. B₁₂ e/ou
Ac. Fólico (várias causas)

Deficiência de Ferro (várias
causas)

Idem

Incompatibilidade Rh
Infecções virais e parasitárias
Queimaduras
Hemorragias
Transfusões incompatíveis
Excesso de oxidantes
Anemia hemolítica auto-imune
Microangiopatias, etc.

O tempo total da eritropoiese, do momento em que a célula tronco pluripotencial é estimulada pela Interleucina-3 ou IL-3 a se dividir, até a formação do eritrócito demanda um período aproximado de oito dias. Somente o reticulócito consome cerca de três dias nesse processo. O eritrócito, ao sair da medula óssea, adquire a forma bicôncava nos primeiros momentos de exposição na circulação sanguínea, processo que é promovido por fatores físico-químicos que regulam a permeabilidade celular com destaques para as bombas de sódio, potássio, cálcio e ATPase. O eritrócito normal terá bom desempenho por 100 dias, aproximadamente. Entre o 100º ao 120º dias de vida eritrocitária, as bombas de permeabilidades perdem gradualmente suas ações biológicas e a morfologia bicôncava muda para a forma esférica. Os eritrócitos esféricos e envelhecidos rolam com dificuldades na microcirculação, notadamente na do sistema reticuloendotelial, onde 80 a 85% serão fagocitados pelos macrófagos, enquanto que cerca de 15 a 20% hemolisam espontaneamente na própria circulação. Por essas razões observam-se alguns poucos eritrócitos deformados em pessoas sem anemia, alguns com corpos de Heinz – corpúsculo indicativo de degradação da hemoglobina e, portanto, possibilidade de apoptose eritrocitária. No processo de fagocitose dos eritrócitos envelhecidos pelos macrófagos, estabelecem-se ações imunológicas de reconhecimento dos produtos fagocitados e que resultarão na liberação de interleucina 3 (IL-3) para estimular as células tronco pluripotenciais a se reproduzirem, bem como, os átomos de ferro acumulados pelos macrófagos e obtidos das moléculas de hemoglobinas dos eritrócitos fagocitados serão passados por meio de receptores celulares específicos aos eritroblastos basófilos, policromáticos e ortocromáticos, para serem utilizados na síntese de moléculas de hemoglobinas.

Por todas essas razões é fundamental o conhecimento da eritropoiese, o desenvolvimento normal das ações de sucesso na formação eritrocitária, bem como as possibilidades de causas de insucesso na eritrogênese. Ao conhecermos essas possibilidades, as análises quantitativas e qualitativas (citológicas) dos eritrócitos se tornam explicáveis quando normais ou alteradas. Para que esse processo de análise se tornasse possível de ser avaliado por diferentes profissionais, surgiram os valores referenciais para as três séries celulares.

Valores referenciais em hematologia

Os valores referenciais em hematologia começaram a ser adotados na década de 20 do século passado em laboratórios americanos e europeus, e na década de 30 no Brasil. Esses valores obedecem basicamente a “distribuição normal” obtida do cálculo matemático da função de densidade de probabilidade, conhecida como distribuição de Gauss. Por meio de análises de populações sadias, estratificadas por faixas etárias e sexo, obtiveram-se valores médios das avaliações desejadas e de seus respectivos desvios padrões, estabelecendo-se o que denominamos atualmente de valores mínimo e máximo.

Todos os valores obtidos em análises hematológicas obedecem esse modelo de estrutura estatística. Inicialmente, os valores hematimétricos foram obtidos de análises químicas e físico-químicas realizadas por processos manuais. Desses processos obtiveram-se não apenas os valores referenciais, mas os conhecimentos básicos de suas reações químicas, das quantificações e das escalas de medições (mm^3 , g/dL, pg, fL, etc.).

Com o advento da automação e, posteriormente, da automação informatizada, obedeceram-se não somente os princípios físico-químicos das análises, bem como a adoção dos valores padrões obtidos pelos métodos manuais. Nas sequências de transferências de procedimentos manuais para os automatizados, e destes para os automatizados – informatizados, surgiram novos dados obtidos de avaliações computacionais de dados, por ex.: RDW (avaliação da superfície eritrocitária), MPV (volume médio plaquetário, etc.).

É importante ressaltar que os valores referenciais, por mais consagrados que sejam na literatura científica, sofrem interferências enormes na sua configuração. Entre essas interferências destacam-se:

- a. extratos sócio-culturais das populações analisadas;
- b. condições de saneamento e estrutura social e ambiental das comunidades (cidades, bairros, hospitais) em que o laboratório atua;
- c. qualidade técnica dos procedimentos analíticos, quer sejam manuais, automatizadas ou automatizadas-informatizadas.

Por todas essas razões, o desejável seria que os valores referenciais fossem extraídos da população sadia na comunidade em que o laboratório atua. Essa é uma questão singular, porém de difícil aplicabilidade. Por isso buscam-se valores referenciais mais abrangentes, por exemplo: ...na população brasileira os valores referenciais são os seguintes....

Entretanto, mesmo na população brasileira há que se considerar as diferenças regionais, sociais e culturais, além das estruturas físicas da cidade (ex.: saneamento básico adequado, sistema de saúde atuante, etc.) em que o laboratório está inserido, como já foi apresentado anteriormente.

Os valores referenciais que apresentamos nas tabelas 1 e 2 a seguir foram obtidos de uma ampla população cujos participantes eram provenientes de cinco cidades do interior dos estados de São Paulo e de Minas Gerais. É possível que esse contingente represente com mais especificidade a população brasileira.

TABELA 1 – Valores mínimos e máximos dos valores eritrocitários, conforme a faixa etária e sexos masculino e feminino em adultos obtidos de populações de cinco cidades brasileiras #.

Eritrograma	RN*	1 a 11 meses	1 a 2 anos	3 a 10 anos	10 a 15 anos	Adulto** masc.	Adulto** fem.
Eritrócitos	5.2	4.0 – 4.9	4.0 – 5.1	4.0 – 5.1	4.0 – 5.1	4.5 – 6.1	4.0 – 5.4
Hemoglobina	17.0	10.6 – 13.0	11.5 – 14.5	11.5 – 14.5	11.5 – 14.5	12.5 – 16.5	11.5 – 15.5
Hematócrito	52.0	33 – 41	34 – 42	34 – 42	34 – 42	40 – 54	36 – 48
HCM	27 – 31	25 – 29	26 – 29	26 – 29	26 – 29	27 – 29	27 – 29
VCM	80 – 100	75 – 90	77 – 90	77 – 90	77 – 90	77 – 92	77 – 92
CHCM	30 – 35	30 – 35	30 – 35	30 – 35	30 – 35	30 – 35	30 – 35
RDW	10 - 15	10 - 15	10 – 15	10 - 15	10 - 15	10 - 15	10 - 15

* Valores médios

** O termo adulto nesse caso é considerado quando os níveis hormonais estão bem estabelecidos e a massa corporal bem definida, geralmente acima dos 15 anos.

#: São José do Rio Preto, SP; Cedral, SP; José Bonifácio, SP; Fronteira, MG; Frutal, MG.

TABELA 2 – Valores mínimos e máximos dos valores globais (contagem absoluta) e específicos (contagem percentual) de leucócitos obtidos de populações de cinco cidades brasileiras #.

Leucócitos	1 a 3 anos		4 a 14 anos		Acima de 14 anos	
	%	absoluta**	%	absoluta**	%	absoluta**
Leucócitos Totais	----	5.0 – 15.0	----	4.5 – 13.5	----	4.0 – 10.0
N. Bastonete *	2 - 8	0.1 – 0.6	2 - 4	0.1 – 0,4	2 - 4	0.1 – 0.4
N. Segmentado *	20 - 40	2.0 – 6.0	35 - 55	2.0 – 6.0	36 - 66	2.0 – 7.5
Eosinófilo	4 - 10	0.2 – 1.5	4 – 8	0.3 – 1.0	2 – 4	0.1 – 0.4
Basófilo	0 – 1	0.0 – 0.1	0 – 1	0.0 – 0.1	0 – 1	0.0 – 0.1
Linfócito	40 – 60	2.0 – 8.0	30 – 55	1.5 – 6.5	25 – 45	1.5 – 4.0
Monócito	4 – 10	0.2 – 1.5	4 – 10	0.2 – 1.0	2 – 10	0.2 – 0.8

* N: Neutrófilo

** : $\times 10^9/L$ ou $\times 1000/mm^3$

#: São José do Rio Preto, SP; Cedral, SP; José Bonifácio, SP; Fronteira, MG; Frutal, MG.

Anemias – Conceitos Básicos

Anemia é uma palavra latinizada (anaemia) proveniente do significado grego de *aima* (sangue) e o prefixo *an* (falta de), resultando a palavra *anaíma* (pessoa com falta de sangue).

Atualmente considera-se por anemia a constatação clínica e laboratorial de uma pessoa com valor de hemoglobina abaixo do esperado para sua faixa etária, conforme mostra a tabela 3, a seguir:

Tabela 3 – Valores normais para hemoglobinas em diferentes fases do desenvolvimento etário.

Faixas Etárias	Hb (g/dL)*
Sangue de cordão (RN)	13,0 – 20,0
Primeiro dia de vida	15,0 – 23,0
Crianças de 1 mês a 6 anos	10,5 – 14,5
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

*As variações de valores variam discretamente entre diferentes laboratórios.

As causas que induzem o estado de anemia em uma pessoa são muito diversas, entretanto as principais delas se observam como consequências de vários tipos de doenças (ex.: hemorragias, câncer, aplasia de medula, etc), bem como por alterações decorrentes de insucessos biológicos da própria eritropoiese. Por essas razões, a definição de anemia é a redução de concentração do teor de hemoglobina.

O estado de anemia, notadamente a anemia crônica, tem consequências ao portador e que podem ser resumidas em dois mecanismos que alteram processos fisiológicos resultantes de sua ação normal, a saber:

- a) O transporte deficitário de oxigênio pela redução da hemoglobina diminuem as atividades metabólicas de todas as células e induz em disfunções orgânicas generalizadas, cujos principais sintomas caracterizam-se por cansaço, fraqueza e mal estar geral.
- b) Particularmente nos processos crônicos de anemia, o organismo procura se adaptar à situação patológica com evidentes desgastes fisiológicos, especialmente para o sistema cárdio-respiratório.

Deve-se ressaltar que ao considerarmos o estado anêmico de uma pessoa é necessário que, além de avaliar a concentração do teor da hemoglobina, é preciso a avaliação completa do hemograma, observando com detalhe os resultados do eritrograma e, com especificidade, os valores dos índices hematimétricos de VCM (volume corpuscular médio) e HCM (hemoglobina corpuscular média). Justamente esses dois índices determinam a classificação laboratorial das anemias em microcíticas/hipocrômicas, normocíticas/normocrômicas, e macrocíticas.

Além dos valores do eritrograma é importante ressaltar a essência da morfologia eritrocitária que se obtém da criteriosa análise citológica efetuada em microscópio. Por mais parâmetros que tenha o mais moderno contador automatizado de células, jamais ele alcançara as centenas de parâmetros que a mente humana de um profissional experimentado poderá realizar.

Outros testes importantes são fundamentais no estabelecimento de causas e consequências de anemias, conforme o exposto na tabela 4.

Tabela 4 – Principais análises para determinar causas e consequências de anemias.

Análises (*)	Significado
Contagem de Reticulócitos	Diminuída: anemias hipoproliferativas Aumentada: anemias hemolíticas, hemorragia aguda Normal: importante realizar mielograma
Ferro sérico	Diminuído: ferropenia Aumentado: sobrecarga de ferro Normal: início de anemia (*)
Capacidade total de ligação do ferro	Diminuída: neoplasias, nefropatias, hipotransferrinemia (*) Aumentada: ferropenia Normal: pode ocorrer no início da anemia
Saturação de transferrina	Diminuído: ferropenia Aumentada: anemias hemolíticas e sobrecarga de ferro Normal: anemias por outras causas
Ferritina	Diminuído: ferropenia (**) Aumentado: Infecções, inflamações, sobrecarga de ferro, anemias hemolíticas, lesões hepáticas e alcoolismo (***) Normal: anemias por outras causas que não seja ferropenia ou hemolítica
Eletroforese de hemoglobinas	Alterada: Hb S (doença falciforme e outras variantes) Hb H (talassemia alfa) Hb A ₂ aumentada (tal. Beta menor), etc Normal: anemias por outras causas
Dosagem de G6PD	Diminuída: deficiência de G6PD Aumentada: anemias por outras causas Normal: anemias por outras causas

(*) em casos de suspeita clínica de anemia.

(**) na ausência de inflamações, infecções, etc, a ferritina diminui antes da redução do ferro sérico.

(***) por ser a ferritina uma proteína de fase aguda, suas variações são dependentes do estado clínico do paciente.

Classificação das Anemias

A classificação das anemias pode obedecer vários critérios, entre os quais, os mais utilizados na prática laboratorial, destacam-se a classificação laboratorial e a classificação fisiopatológica.

A **classificação laboratorial** da anemia se suporta nos resultados dos índices hematimétricos (VCM e HCM), resultando em três tipos de anemias: normocítica/normocrômica, microcítica/hipocrômica e macrocítica, conforme o esquema abaixo:

Classificação Laboratorial
de anemias

```
graph TD; A[Classificação Laboratorial de anemias] --> B[Normocítica]; A --> C[Microcítica]; A --> D[Macroscítica]; B --> E[Normocrômica]; B --> F[Hipocrômica];
```

	Normocítica	Microcítica	Macroscítica
	Normocrômica	Hipocrômica	
Eritrócitos	↓	↓/N↑	↓
Hemoglobina	↓	↓	↓
Hematócrito	↓	↓	↓
VCM	N	↓	↑
HCM	N	↓	N
CHCM	N	N/↓	N
RDW	↑	↑	↑

A classificação laboratorial de anemias é, portanto, a forma mais comum na comunicação entre laboratório e médico, entretanto há de se destacar que nem sempre a anemia normocítica/normocrômica é indicativo que os eritrócitos estejam normais em seus tamanhos, formas e cromias.

Na realidade a maioria das anemias normocíticas/normocrômicas tem diversidades morfológicas caracterizadas por macrócitos, micrócitos e poiquilócitos, em que o valor médio do volume eritrocitário (VCM) resulta normal. Da mesma forma a diferença de cromia, por exemplo, micrócitos hipocrômicos e macrócitos normocrômicos resulta em valor médio de hemoglobina intraeritrocitária (HCM) normal.

Por fim, em casos de anemia normocítica/normocrômica com alterações morfológicas de eritrócitos, esses fatos devem ser relatados, por exemplo: “anemia normocítica/normocrômica com morfologia eritrocitária composta por micrócitos hipocrômicos, esquisócitos, células em alvo e macrócitos”.

O valor de RDW quando associado ao VCM facilita a configuração da morfologia eritrocitária que poderá ser encontrada na análise morfológica, conforme o quadro a seguir:

RDW	VCM Normal	VCM Diminuído	VCM Aumentado
Normal	Normocitose	Microcitose	Macrocitose
		homogênea	Macro-poiquilócitos
Aumentado	Anisocitose	Micro-poiquilócitos	Macro-poiquilócitos
	Micro-macroscítica	(*)	(**)

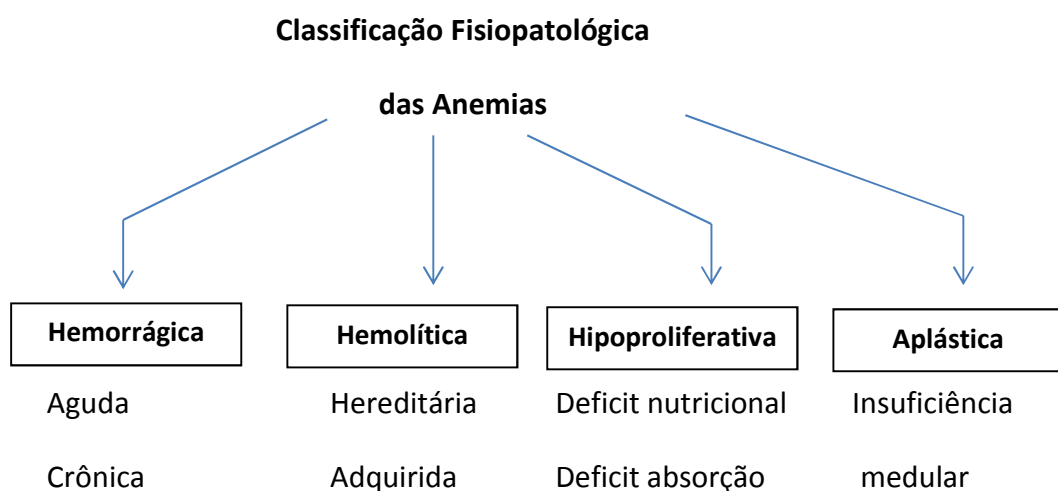
* : Dacriócitos, micro-esquisócitos, leptócitos, etc.

** : Macrócitos policromatófilos (reticulocitose), megalócitos, etc.

Quando se tem informações clínicas do paciente, a classificação laboratorial se torna mais fácil de ser compreendida, porém, nem sempre essas informações são prestadas ao laboratório, conforme a exposição a seguir:

- a) Situações patológicas mais comuns nas **anemias normocíticas/normocrômicas**: câncer, doença renal, invasão tumoral da medula óssea, hemorragia aguda, inflamação, anemia hemolítica adquirida, anemia falciforme e fase inicial da deficiência de ferro.
- b) Situações patológicas mais comuns nas **anemias microcíticas/hipocrômicas**: deficiência crônica de ferro, hemorragia crônica, talassemias menor, intermédia e maior, S/beta talassemia, S/alfa talassemia e anemia sideroblástica.
- c) Situações patológicas mais comuns nas **anemias macrocíticas**: deficiências de vitamina B₁₂ e folatos, mielofibrose, doenças hepáticas e anemia megaloblástica, anemia hemolítica com reticulocitose.

Por outro lado as anemias classificadas por meio das alterações fisiopatológicas do paciente determina o que denominamos por **classificação fisiopatológica da anemia**, conforme mostra o esquema a seguir:



As causas de cada um dos processos que originam as falhas fisiopatológicas são muito variadas, mas as principais são:

Hemorragia aguda: sangramento volumoso, interno ou externo.

Hemorragia crônica: sangramento contínuo, de pequeno volume, nos tratos gastrointestinal, urinário ou reprodutivo.

Hemolítica hereditária: hemoglobinopatias, enzimopatias e doenças de membrana.

Hemolítica adquirida: malária, queimadura, auto-imune, hiperesplenismo, hemoglobinúria paroxística noturna, doença hemolítica do recém-nascido e transfusão ABO incompatível.

Hipoproliferativa por déficit nutricional: deficiências de vitamina B₁₂, ácido fólico ou ferro.

Hipoproliferativa por déficit de absorção: deficiência de receptor celular para vitamina B₁₂ (fator intrínseco), deficiência de transferrina, síndrome de mal absorção e gastrectomia.

Aplástica por insuficiência de produção medular: destruição do tecido medular por vírus, toxicidade, mielofitose (mielofibrose, mieloma, metástase e leucemia).

De todas as situações apresentadas as dificuldades mais frequentes se devem à diferenciação laboratorial das duas principais causas das anemias microcíticas e hipocrômicas, ou seja, anemia ferropriva e talassemias alfa ou beta menor.

Diagnóstico Laboratorial das Anemias Microcíticas e Hipocrômicas

O diagnóstico laboratorial das anemias microcíticas e hipocrômicas inicia-se com a avaliação do eritrograma, conforme mostra a tabela 5. O caso 1 exemplifica um eritrograma típico de anemia ferropriva, enquanto que o caso 2 exemplifica a anemia microcítica e hipocrômica de talassemia beta menor.

Tabela 5 – Eritrogramas típicos de anemia ferropriva (caso 1) e talassemia beta menor (caso 2), independente de sexo e idade.

	Caso 1		Caso 2	
Eritrócitos (/mm ³)	4.000.000	(↓)	5.000.000	(N)
Hematócrito (%)	30	(↓)	34	(↓)
Hemoglobina (g/dL)	10	(↓)	10	(↓)
VCM (fL)	75	(↓)	68	(↓)
HCM (pg)	25	(↓)	20	(↓)
CHCM (g/dL)	33	(N)	29	(N)
RDW (%)	17	(↑)	17	(↑)
Morfologia Comum	Anisocitose		Anisocitose	
	Poiquilocitose		Poiquilocitose	
	Micróцитos		Micróцитos	
	Leptóцитos		→ Esquisóцитos	
	Céls. Alvo		→ Dacrióцитos	
	Hipocromia		Céls. Alvo	
			Hipocromia	
			→ Pontilhados basóфилос	

Obs.: As setas (→) indicam os principais diferenciadores citológicos, comuns em portadores de talassemias

As avaliações específicas com a utilização de técnicas que dimensionam o “status” de ferro, as eletroforeses qualitativa e quantitativa de hemoglobinas e a contagem de reticulócitos, são capazes de diferenciar a grande maioria dos casos de anemia microcítica e hipocrômica.

O “status” de ferro no processo da investigação laboratorial é composto por três dosagens bioquímicas (ferro sérico, ferritina e capacidade total de ligação do ferro ou CTLF) e uma avaliação obtida por cálculo matemático que resulta na saturação de transferrina ($\text{Ferro sérico} \times 100/\text{CTFL}$). Por meio do painel de avaliação de Ferro sérico, ferritina, CTLF e saturação da transferrina é possível supor as principais causas de anemia microcítica e hipocrômica (tabela 6).

Muitas vezes, entretanto, os resultados da avaliação do “status” de ferro não consegue identificar a causa da anemia microcítica e hipocrômica. Nessas situações as eletroforeses qualitativas e quantitativas de hemoglobinas podem auxiliar a definição do diagnóstico. A consulta à tabela 6 facilita essa interpretação.

A contagem de reticulócitos auxilia o diagnóstico laboratorial da anemia microcítica e hipocrômica. Nas situações decorrentes da deficiência de ferro e na anemia sideroblástica, os valores de reticulócitos se situam abaixo da normalidade ($< 0,5\%$). Nas talassemias alfa e beta menor é comum observar discreta reticulocitose ($> 2,5\%$ a $3,5\%$). Nas talassemias interativas (Tal. Beta/Hb S e Tal. Beta/Hb C) há evidente reticulocitose ($> 3,5\%$). Nos casos por intoxicação de chumbo a contagem de reticulócitos pode estar normal, porém é mais frequente a sua diminuição.

Finalmente, o diagnóstico diferencial para anemia microcítica e hipocrômica em pessoas intoxicadas pelo chumbo se faz por meio da dosagem de chumbo sanguíneo. Para a anemia sideroblástica é comum os procedimentos da coloração dos eritrócitos e eritroblastos de esfregaços de sangue medular com o corante azul da Prússia.

Tabela 6 – Painel de avaliação do “status” de ferro das principais anemias microcíticas e hipocrômicas.

Causas	Painel do “status de ferro”			
	Ferro Sérico	Ferritina	CTLF	Saturação^(*)
Def. Ferro	D	D	N/A	D
Inflamação + Def. Ferro	D	A	N/D	D
Talasseмииas	N	N/A	N	N/A
Sideroblástica	N	N/A	N	N/A

A = aumentado, D = diminuído, N = normal.

(*) = Índice de saturação da transferrina, ou saturação da transferrina.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS HEMOGLOBINOPATIAS

INTRODUÇÃO

As alterações das hemoglobinas envolvem a síntese estrutural e quantitativa dos aminoácidos que compõem as diferentes cadeias de globinas, bem como as moléculas e enzimas que participam da formação do grupo heme.

As alterações que envolvem as globinas se devem às modificações nos genes responsáveis pelo sequenciamento e estrutura de cada tipo de polipeptídeo de globina, bem como naqueles destinados à regulação quantitativa da síntese equilibrada entre as globinas alfa e não-alfa (β , δ e γ). Quando um determinado gene apresenta uma de suas bases nitrogenadas substituída por outra diferente, resulta na formação de moléculas de hemoglobinas com características bioquímicas alteradas em relação às hemoglobinas normais, e são por isso denominadas hemoglobinas variantes. Por exemplo, a hemoglobina S se deve à introdução do aminoácido valina (Val) no lugar do ácido glutâmico (Glu) na posição número 6 da cadeia polipeptídica da globina beta por meio de um processo conhecido por mutação. Essa anormalidade se deve a uma troca da base nitrogenada adenina (A) pela timina (T), conforme a seqüência representada a seguir:

Aminoácidos	5		6		7
Bases nitrogenadas da globina β A	CCT	—	GAG	—	GAG
Aminoácidos da globina β A	Pro		Glu		Glu
Bases nitrogenadas da globina β S	CCT	—	GTG	—	GAG
Aminoácidos da globina β S	Pro		Val		Glu

As mutações que afetam o controle dos genes para as sínteses equilibradas entre as globinas alfa e não-alfa são muito diversificadas. Em geral, essas mutações provocam diminuições no volume de síntese de uma das globinas com intensidades variáveis, ou até mesmo ausência de síntese. Nesses casos ocorrem desequilíbrios do conteúdo entre a globina produzida normalmente e

a alterada. Quando a mutação bloqueadora de síntese de globina atinge, por exemplo, o gene alfa (talassemia alfa), há diminuição do conteúdo de globina alfa dentro das células eritróides, enquanto a síntese de globina beta se faz normalmente. Essa diferença de síntese entre globinas alfa e beta promove o desequilíbrio entre elas, e as conseqüências fisiopatológicas são proporcionais ao tamanho do desbalanceamento ocorrido.

Dessa forma, conceitualmente se denominam **hemoglobinas variantes** aquelas que apresentam 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. As **hemoglobinas anormais** são aquelas consideradas variantes, bem como as hemoglobinas normais com alterações quantitativas, por exemplo: Hb A₂ elevada, Hb Fetal elevada, Hb A₂ diminuída. As **talassemias** consistem um conjunto de síndromes motivadas principalmente por alterações de sínteses quantitativas de globinas alfa e beta, causando desequilíbrio entre elas e variáveis graus de anemias hemolíticas, além de várias outras conseqüências patológicas.. As **hemoglobinopatias** são designações destinadas às hemoglobinas variantes que causam anemia hemolítica, policitemia, cianose ou falcização.

Finalmente, há as hemoglobinas anormais e hemoglobinopatias **não-hereditárias**, que representam um grupo restrito de alterações das hemoglobinas normais causadas por agentes indutores, e são também conhecidas como formas adquiridas. Entre as hemoglobinas anormais não-hereditárias destacam-se a Hb A₂ diminuída nas ferropenias, a Hb A₂ aumentada na malária, no diabetes e na doença de Chagas; a Hb Fetal elevada em certas doenças mielóides, em transplantados renais, em portadores de HIV ou por uso de determinadas drogas, e a Hb H adquirida nas doenças linfó e mieloproliferativas. Por outro lado, as hemoglobinopatias não-hereditárias mais comuns são as metaemoglobinas elevadas por indução de drogas oxidantes (sulfa e derivados, nitritos, anilina etc.), gases e solventes oxidantes.

O grupo heme é tão importante quanto a globina por duas razões: como o agente que coloca o oxigênio à disposição da célula, que a ativa e transfere elétrons, e pelo fato de ser um pigmento corado que possibilita o estudo da diferenciação e maturação dos precursores eritrocitários. Assim, alterações das enzimas que participam das transformações dos compostos químicos envolvidos na síntese do anel de porfirina, para compor com o ferro o grupo heme dão origem às porfírias e protoporfírias eritropoiéticas.

AS HEMOGLOBINAS VARIANTES

A maioria das variantes estruturais é originada por simples substituições de aminoácidos, resultantes de mudanças nas seqüências de nucleotídeos. As alterações estruturais, com conseqüências nas atividades físico-químicas da molécula, estão na dependência da extensão do processo mutacional e dos locais em que esses ocorrem. Dessa forma, as hemoglobinas variantes podem originar-se por:

- a) Substituição de um aminoácido por outro, de características diferentes, na **superfície externa** da molécula. Pode ocorrer também a substituição de dois aminoácidos por outros dois, em uma mesma cadeia, sendo, entretanto, condição muito rara. As substituições de aminoácidos na superfície externa, com exceção feita às Hb S, Hb C e Hb E, não produzem alterações significantes no funcionamento da molécula. Nesse grupo estão cerca de 650 tipos de Hb variantes não patológicas (ex.: Hb O, Hb J, Hb I, Hb N, Hb D, etc.). Substituições de aminoácidos na **superfície interna** da molécula, envolvendo resíduos polares e não-polares, tem ocorrido preferencialmente nos locais invariantes da molécula, incluindo aqueles que fazem parte do "pacote" do grupo heme, cuja principal função é protegê-lo da entrada de água, bem como dos aminoácidos que participam dos contatos $\alpha_1 \beta_1$. Qualquer substituição na superfície interna causa instabilidade molecular, geralmente iniciando-se pela oxidação do grupo heme com a formação excessiva de metaemoglobina e precipitação da globina instável. Citologicamente é possível observar a precipitação intra-eritrocitária da globina instável por meio da presença de corpos de Heinz. Nesse grupo estão cerca de 350 tipos diferentes de Hb Instáveis.
- b) Substituições de aminoácidos que participam dos contatos $\alpha_1 \beta_2$, das ligações químicas com o 2,3 DPG, e do resíduo histidina C-terminal da cadeia beta promovem a formação de hemoglobinas variantes com alterações na sua afinidade pelo oxigênio. São poucas as Hb variantes com afinidade aumentada ou diminuída por oxigênio. As que tem afinidade aumentada se destacam por eritrocitoses, enquanto aquelas com afinidade diminuída manifestam-se notadamente por anemia hemolítica.

- c) Substituição dos resíduos de histidina distal ou proximal, que estão ligados ao grupo heme, causam anormalidades que se caracterizam pela oxidação espontânea e contínua do ferro, com formação excessiva de metaemoglobina, fato que dão origem às hemoglobinas variantes do tipo M (Hb M). Os portadores de Hb M são sempre cianóticos, com ou sem anemia.
- d) Adição de um ou mais aminoácidos ao último aminoácido (C-terminal) das globinas alfa e beta, tornando-as longas e manifestando-se como fenótipos talassêmicos alfa e beta.
- e) Fusão entre duas cadeias de globinas diferentes, em especial das cadeias delta-beta que resultam na formação da hemoglobina variante conhecida por Hb Lepore. A fusão inversa, ou seja, beta-delta é conhecida por Hb anti-Lepore. Outras fusões têm sido descritas na literatura e todas essas ocorrências se devem ao "crossing-over" desigual no pareamento dos cromossomos 11.

Assim, somam-se atualmente perto de 1000 variantes estruturais, poucas delas associadas com manifestações clínicas e alterações hematológicas, que podem ser agrupadas em:

- hemoglobinas de agregação;
- hemoglobinas sem alterações fisiológicas;
- hemoglobinas instáveis;
- hemoglobinas com alterações funcionais;
- hemoglobinas com fenótipos talassêmicos.

As hemoglobinas de agregação formam tactóides e cristais, com repercussões clínicas e laboratoriais variáveis. As hemoglobinas S e C participam desse grupo.

As hemoglobinas variantes que não causam alterações funcionais são a maioria, perto de 650 tipos diferentes, e embora apresentem importância bioquímica, genética e antropológica, não produzem efeitos clínicos e laboratoriais significantes.

As hemoglobinas instáveis apresentam graus variáveis de manifestações clínicas e hematológicas, expressando-se laboratorialmente de forma diversificada entre os diferentes tipos descritos na literatura.

As hemoglobinas com alterações funcionais causam metaemoglobinas por Hb M, cianose e alteração de afinidade da hemoglobina pelo oxigênio.

As hemoglobinas com fenótipos talassêmicos são as variantes provocadas por falhas no processo de regulação da síntese de globina pela adição de aminoácidos ao C-terminal das globinas alfa e beta e pelo pareamento desigual do cromossomo 11 no processo da mitose celular.

As tabelas 7 e 8, resumem algumas das hemoglobinas variantes relacionadas com os defeitos estruturais, os genótipos, seus efeitos nos eritrócitos, além de doenças específicas causadas por estas hemoglobinas.

A seguir apresentaremos um resumo das principais hemoglobinas variantes encontradas na nossa população.

Hemoglobina C (Hb C) – Foi descrita pela primeira vez por Itano e Neel em 1950, e em 1958 Hunt e Ingram identificaram que o aminoácido número 6 da globina beta, o ácido glutâmico (Glu), havia sido substituído pela lisina (Lis). Devido à diferença de carga elétrica envolvida (Glu, pI = 3,22 → Lis, pI = 9,74), a globina β^c tornou-se muito menos negativa, fato que sua mobilidade é muito lenta em eletroforese alcalina quando comparada com Hb A, S, Lepore ou Fetal. Entre as hemoglobinas variantes, o genótipo heterozigoto da Hb C, ou Hb AC, é o segundo mais prevalente após a Hb AS na população brasileira, variando entre 0,3% a 1,0%. A homozigose da Hb C (ou Hb CC) é rara e é caracterizada por anemia hemolítica de intensidade variável, com evidências clínicas de cansaço, fraqueza e, eventualmente, esplenomegalia. Laboratorialmente a hemoglobina total oscila entre 9 e 12g/dl, hematócrito entre 30 e 40%, leve a moderada reticulocitose (3 a 7%) e no esfregaço sanguíneo há muitas células em alvo. Eletroforeticamente, a homozigose da Hb C tem concentração de 98% desta hemoglobina, em pessoas com idade superior a seis meses. Outras condições associadas de Hb C com manifestações clínicas são a doença falciforme por Hb SC e a interação entre Hb C e talassemia beta, ou Hb C/Tal. beta cuja avaliação eletroforética se torna visível pela Hb CF. Diferentemente da Hb CC, que não se detecta Hb Fetal com níveis acima do normal, na Hb C/Tal. beta a Hb Fetal geralmente está elevada (>5%). Nesses casos as evidências clínicas são marcadas por palidez, cansaço e esplenomegalia. Laboratorialmente a anemia é

moderada (Hb: 9 – 10g/dl) do tipo microcítica, hipocrômica, muitas células em alvo e reticulocitose acima de 5%.

Hemoglobina D (ou Hb D) – A Hb D é uma hemoglobina variante que apresenta a mesma mobilidade da Hb S em eletroforese de pH alcalino. É separável da Hb S por eletroforese em agar pH ácido (pH 5 a 6), e também por não se insolubilizar em soluções redutoras de oxigênio. Quando associada à Hb A, a heterozigose de Hb AD, o portador é totalmente assintomático, e a fração anormal constitui entre 30 e 50% da hemoglobina total. A prevalência de portadores de Hb AD no Brasil é por volta de 1 caso para cada 5 mil pessoas analisadas. Casos de homozigose de Hb D (Hb DD) são raríssimos, e podem estar associados a discreto grau de anemia (Hb: 10,5 – 12,0 g/dl). Para estabelecer o diagnóstico de homozigose deve-se excluir cuidadosamente, por estudos familiares, a interação da Hb D com a talassemia beta. Nesse caso específico de Hb D/Tal. beta é comum evidenciar no hemograma anemia microcítica e hipocrômica, com hemoglobina total variável de 9,5 a 12 g/dl, VCM abaixo de 77 fl e HCM também abaixo de 27 pg. Situação que oferece dificuldade no diagnóstico laboratorial ocorre quando há associação entre hemoglobinas S e D, ou Hb SD caracterizando um dos tipos que compõe o grupo das doenças falciformes. Neste caso específico, a eletroforese de hemoglobina em pH alcalino não diferencia o genótipo SS da SD, bem como o teste de falcização que é positivo em ambos. O teste mais adequado para a diferenciação se faz por meio de eletroforese em agarose de pH ácido: a Hb S é mais lenta que a Hb D, que se posiciona igual à Hb A.

Após ter sido descrita em 1953, várias outras hemoglobinas que se posicionavam como a Hb D (e não falcizavam) foram estruturalmente diferenciadas conforme o tipo de substituição de aminoácidos. Assim surgiram as Hb D Los Angeles ou Punjab (a mais freqüente entre todas as hemoglobinas variantes que migram na mesma posição da Hb S), Hb D Iran, Hb D Ibadan, etc. todas na posição de Hb S. Atualmente, há dezenas de hemoglobinas variantes que migram na posição de S ou D e que foram denominados por local de origem e que são diferenciadas em eletroforeses em agar ácido, isofocalização, HPLC, e por biologia molecular. A tabela 9 mostra a relação de hemoglobinas que migram na mesma posição de Hb S em pH alcalino, e suas diferenciações estruturais.

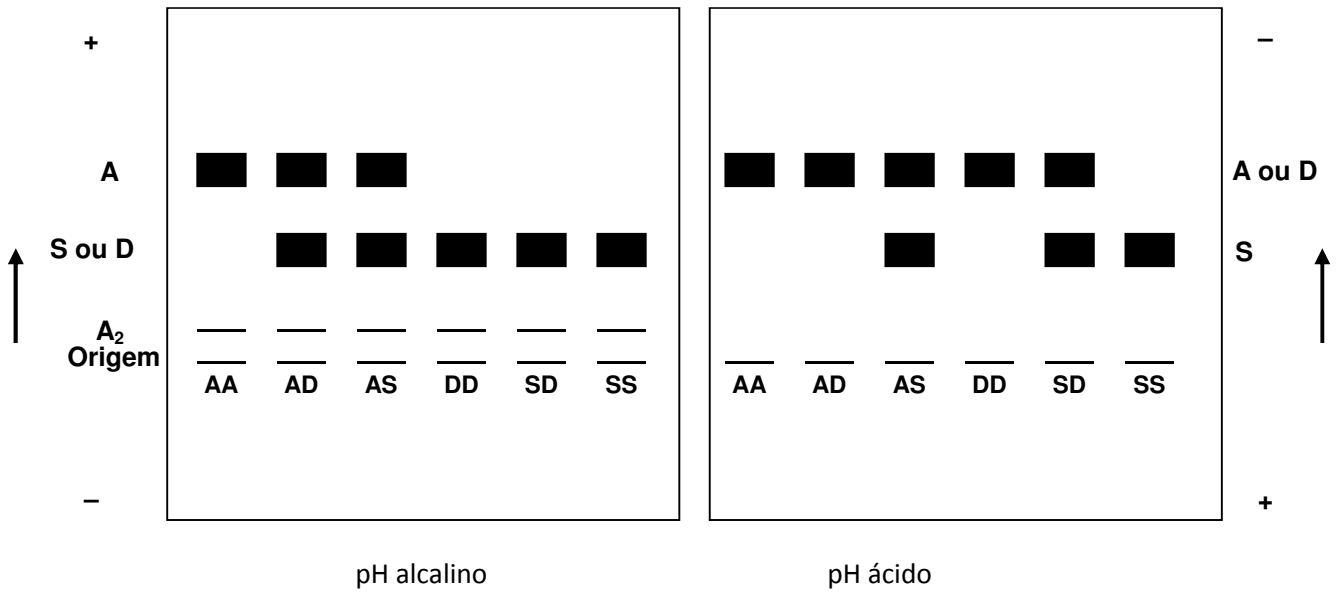


Figura 1: Mapa representativo dos principais genótipos de hemoglobinas, em eletroforeses de pH alcalino e ácido.

Tabela 7: Exemplos de hemoglobinas variantes estruturais e seus efeitos fisiopatológicos.

			Efeitos nos eritrócitos
Hb variante	Defeito estrutural	Genótipos	
S	β 6 Glu \rightarrow Val	SS, SF, SD, SC, SH	Falcização
C	β 6 Glu \rightarrow Lis	CC, CF, SC	Cristais de Hb
E	β 26 Gli \rightarrow Lis	EE	Hemólise
Koln ⁽¹⁾	β 96 Val \rightarrow Met	A + Koln	Heinz e hemólise
Niterói ⁽¹⁾	β 44 a 46 deletados	A + Niterói	Heinz e hemólise
Malmo ⁽²⁾	β 97 His \rightarrow Glu	A + Malmo	Eritrocitose
Kansas ⁽³⁾	β 102 Asn \rightarrow Tre	A + Kansas	Metahemoglobina
Lepore	fusão δ - β	A + Lepore	Microcitose
Kenya	fusão γ - β	A + Kenya	Nenhuma
B ₂ ⁽⁴⁾	δ 16 Gli \rightarrow Arg	A + B ₂	Nenhuma
F Texas ⁽⁵⁾	γ 5 Glu \rightarrow Lis	A + F Texas	Nenhuma

(1) Há vários tipos de hemoglobinas instáveis; (2) Há vários tipos de hemoglobinas com afinidade aumentada por O₂; (3) Há poucos tipos de hemoglobinas com afinidade diminuída por O₂; (4) Há vários tipos de variantes de Hb A₂ por mutação na globina delta; (5) Há vários tipos de variantes de Hb Fetal, somente detectáveis em sangue de recém-nascidos.

Tabela 8: Doenças causadas por hemoglobinas variantes estruturais.

Anemia hemolítica e oclusão vascular falcizante

- Hb SS, Hb SS/Tal. alfa, Hb SS/PHHF
- Hb SD, Hb SC
- Hb S / Talassemia beta

Anemia hemolítica com excreção urinária de dipirróis

- Hemoglobinas instáveis: Hb Koln, Hb Duarte, Hb Zurique, Hb Genova, Hb Seattle, Hb Niterói, etc.

Eritrocitose hereditária

- Hemoglobinas com afinidade aumentada por O₂:
Hb Chesapeake, Hb Malmo, Hb Kempsey, Hb Hiroshima, etc.

Metahemoglobina hereditária e cianose

- Hemoglobina M (Boston, Iwate, Milwaukee, Hyde Park, Saskatson)

Outras formas de cianose hereditária

- Hb variante com afinidade diminuída por O₂: Hb Kansas

Anemia microcítica e hipocrômica

- Talassemias beta interativas com Hb variantes:
(Hb S/Tal.beta, Hb C/Tal.beta, Hb D/Tal.beta)
- Hb Lepore (fusão de globinas $\delta \beta$)
- Hb Constant Spring (alongamento da globina alfa)

Tabela 9: Relação das principais hemoglobinas variantes que migram na posição de Hb S em eletroforese de pH alcalino, que são raríssimas e menos freqüente que Hb D Los Angeles.

Hemoglobina	Mutação	Concentração (%)	Agarose ácida**	Outras informações
Memphis	α 23: Glu→ Gln	< 30	S	
Hasharon	α 47: Asp→ His	< 15	S	Instável
Seally	α 47: Asp→ His	< 20	A	
Arya	α 47: Asp→ Asn	< 20	A	
Montgomery	α 48: Leu→ Arg	< 20	A	
Russ	α 51: Gli → Arg	< 15	A	
Persepolis	α 64: Asp→ Tir	< 20	C	
Daneshgah	α 72: His→ Arg	< 30	A	
D Bushman	β 16: Gli → Arg	25 – 40	A	
D Iran	β 22: Glu → Gln	25 – 40	A	
Alabama	β 39: Glu → Lis	25 – 40	A	
Ocho-Rios	β 52: Asp → Ala	25 – 40	C	
Osu-Christianborg	β 52: Asp→ Asn	25 – 40	A	
Korle-Bu	β 73: Asp→ Asn	25 – 40	A	
P	β 117: His→ Arg	> 40	A	Hipocromia
D Los Angeles	β 121: Glu→Gln	25 – 40	A	
D Beograd	β 121: Glu→Val	25 – 40	A	
S-Antilhas*	β 23: Val → Ile	25 – 40	A	
S-Providence*	β 82: Lis → Asn	25 – 40	A	
S-Oman*	β 121: Glu →Lis	25 – 40	A	
S-Travis*	β 142: Ala→ Val	25 – 40	S ≠ A	
Lepore	Fusão δ - β	< 20	A	Microcitose + Hipocromia

* Duplas mutações na globina beta, além das mutações apresentadas todas tem a mutação da Hb S (β 6 Glu → Val). ** Posição eletroforética similar. ≠ Entre Hb A e Hb S.

Hemoglobina G (ou Hb G) – É um grupo de hemoglobinas variantes que migram pouco atrás da Hb S nas eletroforeses alcalinas em acetato de celulose e agarose. A diferenciação se faz por meio de eletroforese em agarose ácida. Entre as hemoglobinas do tipo G destacam Hb G Audhali (α 23 Glu \rightarrow Val), Hb G Waimanalo (α 64 Asp \rightarrow Asn), Hb Filadelfia (α 68 Asn \rightarrow Lis), Hb G Galveston (β 43 Glu \rightarrow Ala), Hb G Copenhagen (β 47 \rightarrow Asn), Hb G Accra (β 79 Asp \rightarrow Asn), entre outras. A Hb G Filadélfia é a mais freqüente entre todos os tipos de Hb G, e em especial no Brasil e USA pois sua origem é africana. Tem baixa prevalência na população brasileira (cerca de 1: 15000), porém, por ser comum entre pessoas de descendência africana e se situar eletroforéticamente na região da Hb S em eletroforese alcalina, sua avaliação é sempre importante. Por ser a Hb G Filadélfia uma mutante de globina alfa, geralmente afetando um dos quatro genes alfa, sua concentração é quase sempre abaixo de 25%.

Hemoglobina Lepore (ou Hb Lepore) – A Hb Lepore é uma hemoglobina variante, com migração similar à Hb S (ver tabela 9), causada por um pareamento desigual do cromossomo 11 durante a meiose. Como conseqüência dessa desigualdade na posição das cromátides irmãs do cromossomo 11, o "cross-over" entre elas promove a fusão de uma parte do gene delta com outra do gene beta, formando um **gene híbrido delta-beta**, além dos genes delta, gama e beta. Esse gene híbrido delta-beta seqüencia globinas em que a parte inicial é formada por aminoácidos da globina delta e a parte final por aminoácidos da globina beta, conforme mostra o esquema a seguir:



Dependendo do local em que ocorre a fusão delta-beta a Hb Lepore pode originar pelo menos três sub-tipos: Lepore Boston, Lepore Baltimore e Lepore Holanda. Todas apresentam as mesmas características laboratoriais e eletroforéticas, sendo diferenciadas por estudos de composição peptídica. A concentração da Hb Lepore em eletroforese alcalina é variável entre 5 e

15%, com Hb A₂ normal ou diminuída; algumas vezes a Hb Fetal pode estar elevada. Nesses casos, o quadro hematológico laboratorial é típico de talassemia beta menor com aniso-poiquilocitose, microcitose e hipocromia. Situação mais grave ocorre na homozigose da Hb Lepore, com quadro clínico e laboratorial semelhante à talassemia maior ou intermédia. A eletroforese de hemoglobina alcalina nas pessoas com Hb Lepore homozigota mostra a presença de Hb Fetal e Hb Lepore com concentrações elevadas.

Outras hemoglobinas raras – Entre outras hemoglobinas raras que foram identificadas em nossa população destacam as seguintes: N, J (Oxford, Rovigo e Baltimore), I, Porto Alegre, Korle-Bu, e Hb Instáveis (Malmo, Koln, Hasharon, etc.). Entretanto, por não terem coincidências em migrações eletroforéticas com a Hb S, ou interações de importância hematológica, não haverá necessidade de relata-las com detalhes para o propósito deste livro.

AS TALASSEMIAS

As talassemias são um grupo heterogêneo de doenças genéticas causadas pela redução da síntese de globinas alfa e não-alfa (β , δ ou γ). Na realidade as formas mais comuns de talassemias se devem à redução de globina alfa ou de globina beta, situações que originam as talassemias alfa ou beta, respectivamente. Situações mais raras envolvem a redução de síntese conjunta de globinas delta e beta (talassemia $\delta\beta$), ou de delta, beta e gama (talassemia $\delta\beta\gamma$). Em alguns casos de talassemias há redução total de síntese de globina alfa ou de beta, caracterizando as talassemias α^0 ou β^0 , respectivamente, por outro lado quando a redução de síntese é parcial denomina-se por talassemias α^+ ou β^+ . Pelo fato da talassemia beta, bem como as hemoglobinas S, C e E serem as mais prevalentes respectivamente nos continentes europeu, africano e asiático, não é raro a ocorrência de interações entre talassemias e essas hemoglobinas variantes: Hb S/Tal. β^0 ; Hb S/Tal. β^+ , Hb C/Tal β , Hb S/Tal. α e Hb E/Tal. α . As combinações entre genes talassêmicos com Hb S, principalmente, produzem grande diversidade clínica dessa doença genética, com variações que causam desde a morte fetal intra-útero até situações assintomáticas.

A maioria das talassemias obedecem o modelo de herança Mendeliana, caracterizado pela falta de sintomas clínicos nos heterozigotos e pela gravidade clínica nos homozigotos. Assim, clinicamente, as talassemias podem ser classificadas em maior, intermédia, menor e mínima (tabela 10). Para melhor exposição das talassemias apresentaremos separadamente as talassemias alfa e beta.

Tabela 10: Classificação clínica das talassemias.

Alterações	TALASSEMIAS			
	Clínico-laboratoriais	Maior	Intermédia	Menor
Hb (g/dl)	< 7	7 – 10	10 – 13	11 – 15
Reticulócitos (%)	2 – 15	2 – 10	2 – 5	1 – 2
Eritroblastos	+++	++/+	–	–
Aniso-poiquilocitose	++++	+++	++/+	+/-
Icterícia	++	+/-	–	–
Esplenomegalia	+++	++	+/-	–
Alterações ósseas	+++	++	–	–
Dependência de transfusões	+++	+/-	–	–

+: pouco; ++: moderado; +++: acentuado; ++++ muito acentuado; -: ausente

TALASSEMIA ALFA

Entre todas as doenças das hemoglobinas a talassemia alfa é a mais prevalente em quase todos os continentes. Está amplamente distribuída nos países banhados pelo mar Mediterrâneo, Oeste da África, Oriente Médio, Índia, Sudeste da Ásia, China, Tailândia, Malásia e Indonésia. Recentemente, com a introdução de técnicas eletroforéticas mais sensíveis foi possível determinar que a talassemia alfa também é comum no Brasil. Entretanto as formas mais graves de talassemias alfa estão restritas ao sudeste da Ásia e a algumas ilhas do Mediterrâneo. Para que se possa entender essa ampla difusão mundial do gene alfa talassêmico e ao mesmo tempo a restrição regional das formas graves da doença, é necessário conhecer a genética da doença.

Variabilidade genética e laboratorial da talassemia alfa - Os genes que sintetizam globinas alfa estão no cromossomo 16 e são dois genes por cromossomo. As diferentes formas de talassemias alfa estão relacionadas com a inativação dos genes de globinas alfa: quando os dois genes alfa do mesmo cromossomo 16 estão inativados denomina-se por **talassemia α^0** , e quando apenas um gene alfa do cromossomo 16 está afetado designa-se por **talassemia α^+** (figura 2). Pela análise da representação esquemática observa-se que há duas formas de traço alfa talassêmico (ou talassemia alfa heterozigota), ambas assintomáticas porém caracterizadas pela presença de Hb H (tetrâmeros de globinas beta, ou β_4) em eletroforese alcalina de hemoglobina. Da mesma forma há situações patológicas quando três genes alfa estão afetados pela redução de síntese de globina (doença de Hb H), ou de quatro genes alfa afetados (α^0 / α^0) na síndrome da hidropsia fetal, conforme mostra a tabela 11. As deleções que resultam em talassemia alfa são muito variadas e, conseqüentemente, a base molecular dessas talassemias são complicadas, notadamente na talassemia α^+ pois a extensão desta lesão parcial do gene é muito variável. Sob o ponto de vista de distribuição geográfica, a talassemia α^0 é particularmente comum no Sudeste da Ásia e em algumas ilhas do mar Mediterrâneo, regiões em que a doença de Hb H e a síndrome da hidropsia fetal são mais comuns. No Brasil prevalece a talassemia α^+ caracterizada pelo portador silencioso em 10 a 20% da população e traço alfa talassêmico em 1 a 3% da população (tabela 11).

Fisiopatologia da talassemia alfa – A deficiência na síntese de globina alfa resulta basicamente em dois grupos de efeitos patológicos com conseqüências fisiopatológicas e eritrocitárias (figura 3). As Hb H e Hb Bart's são más transportadoras de oxigênio, pois tem afinidade dez vezes maior que a Hb A, não desenvolvem o efeito Bohr (controle da dissociação do oxigênio) e nem a interação dos grupos heme, resultando em hipóxia tecidual com gravidades proporcionais ao grau de lesão do gene alfa. Por serem instáveis, as Hb H (β_4) e Hb Bart's (γ_4) se precipitam no eritrócito e liberam o ferro, causando oxidações com geração de radicais livres que atacam a camada lipo-proteica da membrana (lipoperoxidação). Esse processo deforma os eritrócitos, alterando-lhes também a sua morfologia, fatos que somados à oxidação da proteína Banda 3 da membrana permitem o reconhecimento imunológico dos macrófagos do sistema reticuloendotelial (SRE), causando o hiperesplenismo e a precoce destruição dos eritrócitos, e por fim a anemia. Esse processo é contínuo e dependente da extensão da lesão do gene alfa, resultando em anemia e eritropoiese acelerada, que ao longo do tempo causa a expansão da medula e deformidades ósseas.

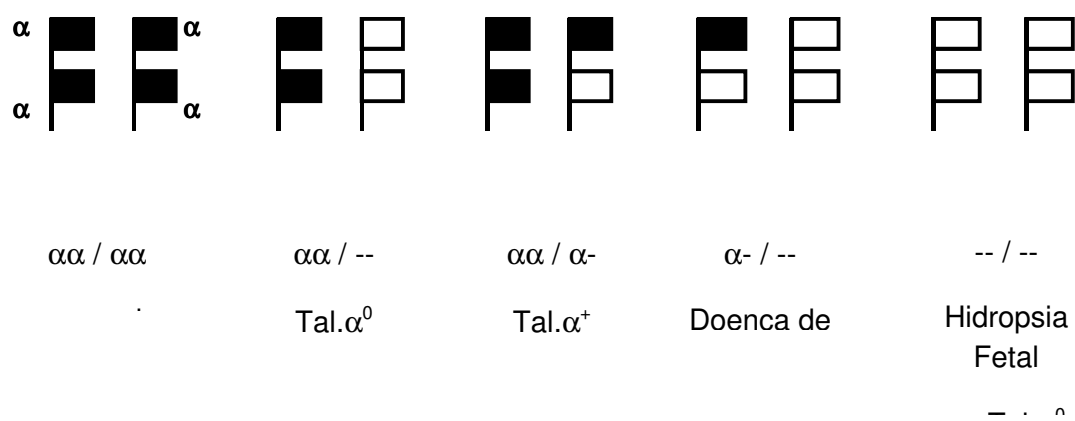


Figura 2: Representação esquemática de genes alfa normal e nas talassemias α⁰ e α⁺, nos pares de cromossomos 16.

Tabela 11: Síndromes alfa talassêmicas. Sinopse geral da relação entre deleção dos genes alfa e conseqüências fisiopatológicas.

Tipo de Talassemia	Deleção do gene	Alterações hematológicas	Alterações clínicas	Alterações laboratoriais
Portador silencioso	(-, α / α , α)	Discreta microcitose ou normocitose VCM: 75-80 HCM: 24-27	Nenhuma Talassemia mínima	Traços de Hb H (<2%) na eletroforese P.I.E. de Hb H: 1/1.000 a 2.000
Traço alfa talassêmico	(-,- / α , α) ou (-, α / -, α)	Microcitose Hipocromia Anemia (Hb: 11-13g/dl) VCM: 65-75 HCM: 20-24	Geralmente assintomático Talassemia menor	Hb H: 2 – 8% P.I.E. de Hb H: 1/250 a 500
Doença de Hb H	(-,- / -, α)	Microcitose Hipocromia Anemia (Hb: 8-11g/dl) VCM: 55-65 HCM: 20-24	Talassemia intermédia Anemia moderada, icterícia, esplenomegalia	Hb H: 10-20% P.I.E. de Hb H: Presença de Hb H em todos os campos do microscópio (1:10 a 1:50)
Hidropsia Fetal	(-,- / -,-)	Anisocitose Poiquilocitose Eritroblastose Anemia (Hb: <7g/dl) VCM: 100-110 HCM:diminuído	Morte neonatal com eritroblastose fetal	Hb Bart's: 80-100% Hb H: 10-20% P.I.E. de Hb H: Idem ao da Doença de Hb H

P.I.E.: Pesquisa intra-eritrocitária, relacionado a proporção de uma célula com Hb H para determinado número de eritrócitos.

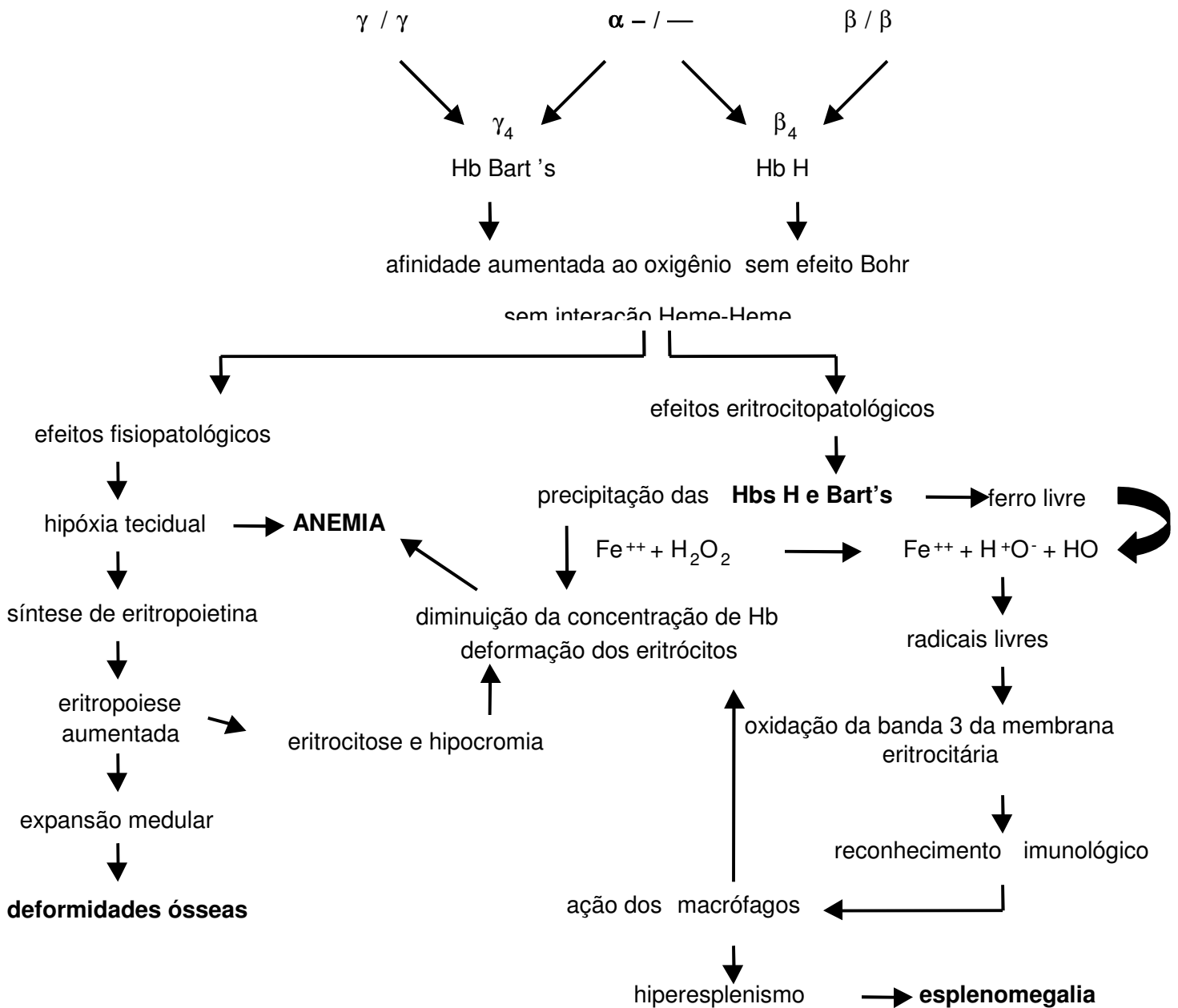


Figura 3: Esquema representativo dos principais efeitos fisiopatológicos e eritrocitopatológicos na talassemia alfa na doença de Hb H.

TALASSEMIA BETA

A talassemia beta é a forma mais importante de talassemias devido aos graus de morbidade e mortalidade causadas pelas conseqüências das intensidades de anemia hemolítica que afeta especialmente os doentes com talassemias beta intermédia e maior. Os constantes avanços terapêuticos e preventivos direcionados aos pacientes com talassemia beta maior tem aumentado a sobrevida com qualidade, com políticas públicas de apoio aos doentes e familiares em vários países, inclusive, o Brasil. A talassemia beta está amplamente distribuída por todos os continentes, com significativa prevalência na Itália, Chipre, Grécia e países do Oriente Médio, locais em que a prevalência do gene beta talassêmico varia entre 2 e 30%. No Brasil, a talassemia beta menor oscila entre 0,5 e 1,5%, e por ano nascem entre 300 e 350 crianças com talassemia beta maior.

Variabilidade genética e laboratorial da talassemia beta – Conforme foi apresentado no capítulo das hemoglobinas normais, os genes que sintetizam globinas beta estão nos cromossomos 11, sendo um gene beta por cromossomo. Há dois tipos de lesões genéticas no gene da globina beta, quais sejam: a) lesão que afeta integralmente o gene de globina beta, com redução total de síntese, e denominado por talassemia β^0 ; b) lesão que afeta parte do gene da globina beta, com redução parcial de sua síntese, e caracterizado por talassemia β^+ (figura 4). Laboratorialmente as talassemias beta homozigotas (β^0 / β^0 , β^+ / β^+ ou β^0 / β^+) são todas graves, com graus acentuados de anemia, dependentes de transfusão de eritrócitos, e muitos efeitos fisiopatológicos. Por outro lado a talassemia beta heterozigota ou menor, independente do genótipo, é clinicamente assintomática, e se manifesta laboratorialmente por anemia microcítica e hipocrômica de grau leve, com alterações morfológicas dos eritrócitos (esquisócitos, micrócitos, dacriócitos e pontilhados basófilos), e bilirrubina indireta com discreta elevação. A tabela 18 resume as principais alterações das talassemias beta. Os defeitos moleculares que causam os diferentes haplótipos da talassemia beta são pelo menos 170 tipos de mutações quer sejam por transcrição, processamento de RNAm, translação e instabilidade pós-translação no gene da globina beta. Os estudos moleculares tem especial interesse antropológico, e ainda não foi possível relacioná-los eficientemente com a clínica das talassemias beta maior e intermédia.

Fisiopatologia da talassemia beta – O processo fisiopatológico da talassemia beta está relacionado com o desequilíbrio que se verifica entre a síntese de globinas alfa e beta. Com a

síntese de globina beta afetada por redução parcial (β^+) ou total (β^0), a relação α/β supera o valor de equilíbrio que é de 1,0. A globina alfa, que não teve sua síntese alterada, apresenta produção normal, e como não há globina beta suficiente para formar tetrâmeros $\alpha_2\beta_2$ resultará na precipitação de globinas alfa livres nos eritroblastos. Essa precipitação causa situações patológicas intra-eritrocitárias, deformando os eritrócitos, que são retirados precocemente da circulação pelo SRE, causando anemia hemolítica e esplenomegalia. A hemoglobina predominante nos eritrócitos da talassemia beta maior é a Hb Fetal, que tem elevada afinidade por oxigênio e por isso induz a hipóxia tecidual, fato que desencadeia vários efeitos patológicos orgânicos, conforme mostra a figura 5. Resultante de todos esses processos deletérios as alterações laboratoriais são muito evidentes, cuja sinopse pode ser analisada na tabela 13.

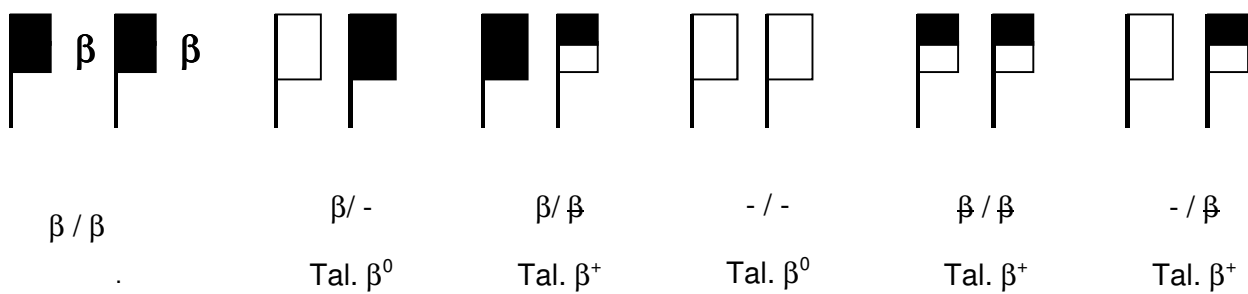


Figura 4: Representação esquemática de genes beta normal e nas talassemias β^0 e β^+ , nos pares de cromossomo 11.

Tabela 12: Resumo das principais alterações nas talassemias beta heterozigota e homozigota.

Talassemias	Alterações		
	Clínicas	Laboratoriais	Eletroforéticas
β^+ heterozigoto	Discreto grau de anemia	Hb: 10 – 13g/dl Microcitose (+) Hipocromia (+)	Hb A ₂ > 4% Hb Fetal: 0 – 5%
β^0 heterozigoto	Discreto grau de anemia	Hb: 10 – 13g/dl Microcitose (+) Hipocromia (+)	Hb A ₂ > 4% Hb Fetal: 0 – 5%
β^+ homozigoto	Tal. intermédia ou maior (dependente de transfusão)	Hb: 7 – 10g/dl Anisocitose (+++) Hipocromia (+++)	Hb A: 60 – 80% (*) Hb A ₂ : 2 – 6% Hb Fetal: 20 – 40%
β^0 homozigoto	Tal. maior (dependente de transfusão)	Hb: < 7g/dl Anisocitose (++++) Hipocromia (++++) Eritroblastos (++)	Hb A: ausente (*) Hb Fetal > 90% Hb A ₂ : 2 – 6%

(*) Verificar se o sangue do paciente não está contaminado por transfusão de eritrócitos.

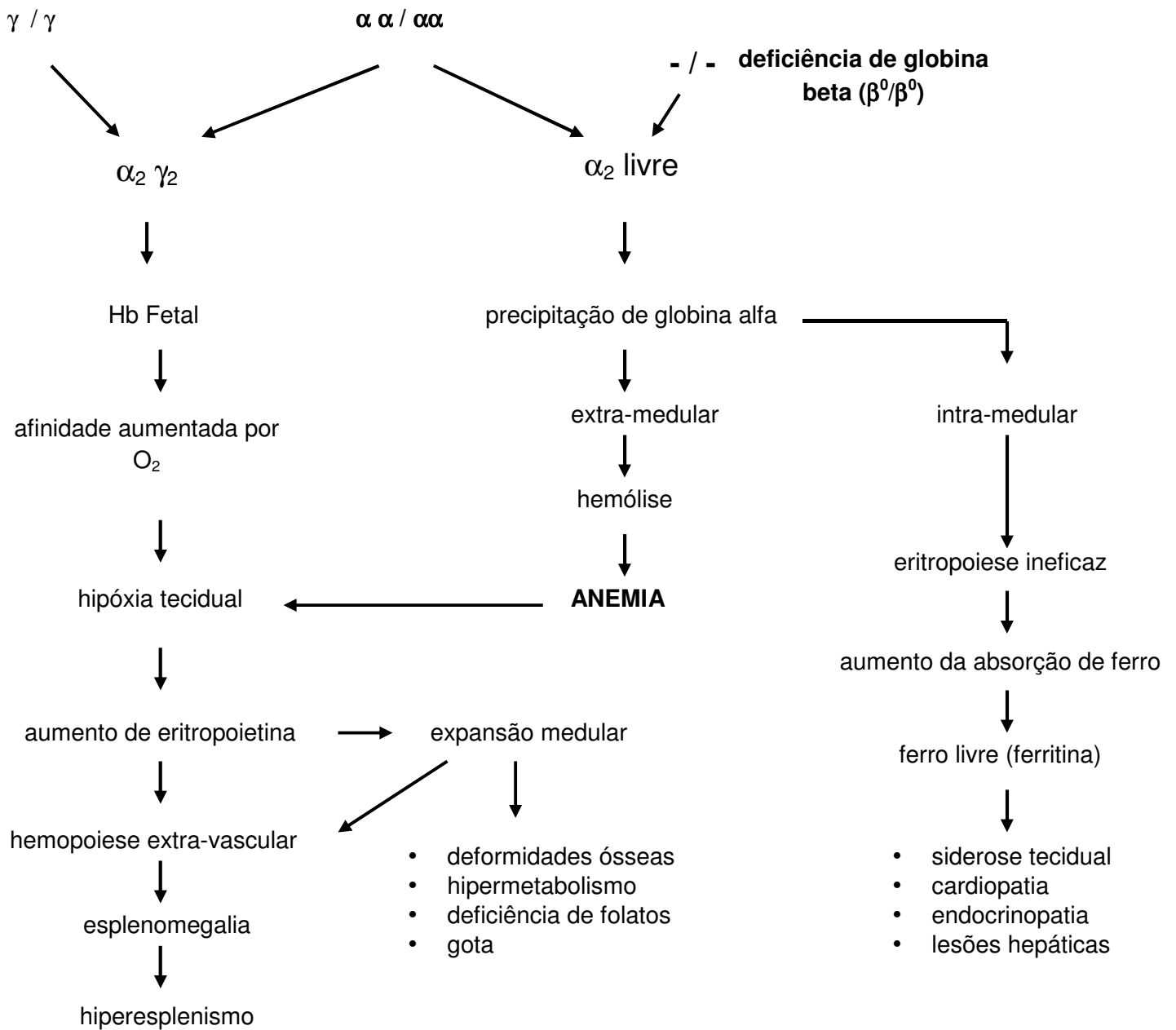


Figura 5: Esquema representativo dos principais efeitos fisiopatológicos e eritrocitopatológicos na talassemia beta maior (β^0/β^0).

Tabela 13: Sinopse das alterações laboratoriais em doentes com talassemia beta maior (β^0/β^0 , β^+/ β^+ ou β^0/β^+).

TALASSEMIA BETA MAIOR															
CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS															
[] Hb Fetal – 20 a 90%															
[] Anemia hemolítica e hipocrômica (Hb < 7g/dl)															
[] Morfologia eritrocitária:	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%;">anisocitose</td> <td style="width: 50%;">poiquilocitose</td> </tr> <tr> <td>células em alvo</td> <td>esferócitos</td> </tr> <tr> <td>formas bizarras</td> <td>macrócitos</td> </tr> <tr> <td>células fragmentadas</td> <td>micrócitos</td> </tr> <tr> <td>siderócitos</td> <td>hipocromia</td> </tr> <tr> <td>pontilhados basófilos</td> <td>eritroblastos</td> </tr> <tr> <td></td> <td>anel de Cabot</td> </tr> </table>	anisocitose	poiquilocitose	células em alvo	esferócitos	formas bizarras	macrócitos	células fragmentadas	micrócitos	siderócitos	hipocromia	pontilhados basófilos	eritroblastos		anel de Cabot
anisocitose	poiquilocitose														
células em alvo	esferócitos														
formas bizarras	macrócitos														
células fragmentadas	micrócitos														
siderócitos	hipocromia														
pontilhados basófilos	eritroblastos														
	anel de Cabot														
[] Reticulócitos: aumentados															
[] Leucócitos: freqüentemente elevados com desvio à esquerda															
[] Plaquetas: normais															
[] Ferro sérico e capacidade de transporte: elevada															
[] Ferritina: elevada															
[] LDH sérico: elevado															
[] Bilirrubina indireta: elevada															
[] Urobilinogênio na urina: elevado															
[] Sobrevida dos eritrócitos: diminuída															
[] Fragilidade osmótica: diminuída															
[] Fragilidade mecânica: aumentada															
[] Medula óssea: hiperplasia das células eritróides															

Doença Falciforme

Doença falciforme é um termo genérico usado para determinar os diferentes tipos das síndromes falcêmicas e que se caracterizam pelo predomínio da concentração de Hb S frente aos outros tipos de hemoglobinas com a qual está combinada. Assim, há vários tipos de doença falciforme, conforme mostra a tabela 14.

Tabela 14 – Diferenciação dos principais genótipos de Hb S relacionados aos valores de hemoglobina (Hb g/dl), volume corpuscular médio (VCM), reticulócitos e Hb Fetal.

Doença	Genótipo	Hb (g/dl)	VCM (fl)	Reticulócitos (%)	Hb Fetal (%)
Anemia Falciforme	β^S / β^S $\alpha\alpha / \alpha\alpha$	5 – 9	85 – 110	10 – 20	2 – 10
Hb S/tal α^*	β^S / β^S α^- / α^-	6 – 10	70 – 80	5 – 10	2 – 20
Hb SC	β^S / β^C $\alpha\alpha / \alpha\alpha$	9 – 13	75 – 85	5 – 10	1 – 5
Hb S/tal β^0	β^S / β^0 $\alpha\alpha / \alpha\alpha$	7 – 10	60 – 70	5 – 15	5 – 20
Hb S/tal β^{+**}	β^S / β^+ $\alpha\alpha / \alpha\alpha$	9 – 11	60 – 70	5 – 10	5 – 10

* - Deleção de dois genes alfa

** - Em eletroforese identificam-se as frações de Hb A, F e S; a Hb S tem concentração maior que a Hb A.

Com referência específica à anemia falciforme, trata-se do estado de homozigose da Hb S, por isso representado quase invariavelmente por Hb SS, apesar de

contar níveis de Hb Fetal com concentrações entre 2 e 10%. As pessoas que padecem desta doença revela, quase invariavelmente, repetidos episódios dolorosos, geralmente do tipo vasculoclusivo, com ou sem efeitos mielodepressivos (deficiência temporária da medula óssea em produzir eritrócitos). Os sinais e sintomas são especialmente causados por anemia crônica, períodos de agravamento de anemia, dores nas juntas e nas extremidades de mãos e pés, dores abdominais, necrose asséptica da medula, acidentes cerebrovasculares, infartos pulmonares, entre outros. A tabela 15 resume, também, as alterações específicas da anemia falciforme.

Tabela 15 – Alterações laboratoriais específicas na anemia falciforme.

Exames laboratoriais	Valores esperados
Concentração da Hb S ^(*)	90 – 98%
Dosagem de Hb Fetal	2 a 10%
Tipo de anemia	Normocítica e normocrômica
Dosagem de Hb	7 a 9 g/dL
Contagem de reticulócito	5 a 30%
Leucócitos ^(**)	Acima de 10 mil
Plaquetas	Plaquetose, com anisocitose
Fragilidade osmótica	Diminuída
Bilirrubina indireta	Acima de 5mg/dL
Urobilinogênio urinário	Elevado
Urobilinogênio fecal	Elevado
Hematúria	Frequente
Ácido úrico sérico	Frequentemente elevado
Ferro sérico	Normal ou aumentado
Ferritona	Frequentemente elevada
Fostatase alcalina sérica	Elevada nas crises

(*) Avaliada por eletroforese ou cromatografia HPLC

(**) Durante as crises dolorosas. Pode ter desvio à esquerda.

Os recém-nascidos com anemia falciforme geralmente não apresentam os problemas relatados acima devido à alta concentração de Hb Fetal presente nos eritrócitos, durante os dois primeiros meses de vida. A partir do terceiro mês de vida, quando os níveis de Hb Fetal caem para próximo de 2%, a doença começa a aparecer. A importância da Hb Fetal na anemia falciforme se deve ao fato de sua interação com a Hb S, num mesmo eritrócito, impede que o processo de falcização deforme a célula até o estado de “falcização irreversível”. Por essa razão, um dos principais controles que se faz na avaliação laboratorial de quem tem a anemia falciforme é o nível de Hb Fetal. Quando a Hb Fetal está acima de 5%, é comum que os episódios de crises dolorosas causadas pelas oclusões vasculares sejam menores.

O **traço falciforme (Hb AS)** caracteriza o portador assintomático, laboratorialmente representado pela associação entre as hemoglobinas A e S, ou Hb AS. A concentração da Hb S no traço falciforme é sempre menor que a da Hb A e, por essa razão, o portador heterozigoto não tem anemia e não padece da doença.

A representação esquemática das posições eletroforéticas de genótipos AS, SS e SD, mostrada na figura 1, auxilia a interpretação laboratorial de algumas situações da presença de Hb S.

Por fim, a importância que se dá à doença falciforme no Brasil se deve ao contingente populacional negro ser próximo de 40% da nossa população. Como se sabe, a origem da Hb S deve ter ocorrido entre 50 a 100 mil anos em pelo menos três regiões da África e em duas da Ásia. Com influxo de populações africanas escravas para o Brasil desde o ano de 1530 até por volta de 1830, o gene da Hb S espalhou-se por todo o país. Por essa razão a prevalência do traço falciforme em nosso país é variável entre 2 e 8%, conforme a região, e uma pessoa em cada 15 mil é portadora da doença falciforme.

Referências Bibliográficas

1. Bain BJ, Gupta R. **A – Z of Haematology**. Blackwell Publi., London, 2003.
2. Bunn HF, Aster JC. **Pathophysiology of blood disease**. Ed. Mac Graw Hil, Boston, 2001.
3. Dacie JV & Lewis SM. **Practical Haematology**. 8th ed. Churchill Livingstone. Ed. Edinburgh, 1995.
4. Hillman RS, Finch CA. **Red cell manual**. F.A. Davis Co, Philadelphia, 7th ed, 1996.
5. Hoffbrand AV, Lewis SM & Tuddenham EGD. **Postgraduate Haematology**. 6th ed. Oxford, 2008.
6. Hoffbrand AV, Petit JE & Moss PAH. **Haematology Essential.**, ed. Blackwell Science, Oxford, 2001.
7. Howard MR & Hamilton PJ. **Haematology**. Churchill Livingstone Ed. London, 1997.
8. Hughes-Jones NC & Wickramasinghe SN. **Lecture notes on Haematology**. 5th ed. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1993.
9. Kanp G. **Cell and molecular biology**. 2th ed. John Wiley & Sons, Inc. 1999.
10. Lorenzi T. **Manual de Hematologia. Propedêutica e clínica**. Ed. Medsi, 3^a ed., Rio de Janeiro, 2003.
11. Naoum PC. **Hemoglobinopatias e Talassemias**. Ed. Sarvier, São Paulo, 1997.
12. Naoum PC. CD-Rom **“Doenças dos eritrócitos”**. Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, 2005.
13. Naoum PC & Naoum FA. **Doença das células falciformes**. Ed. Sarvier, São Paulo, 2004
14. Naoum FA. **Doenças que alteram os exames hematológicos**. Ed. Atheneu, São Paulo, 2010.
15. Oliveira AGR & Poli Neto A. **Anemias e Leucemias**. Ed. Rocca, São Paulo, 2004.
16. Provan D & Henson A. **ABC of Clinical Hematology**. BMJ Publ. Group, London, 1998.
17. Provan D & Griubbean J. **Molecular Haematology**. Blackwell Science, Oxford, 2000.
18. Rodgers GP. **Sickle cell disease and thalassaemia**. Ed. Ballière Tindall, London, 1998.
19. Rowan RM, Assendeler Ow, Preston FE. **Advanced Laboratory methods in haematology**. Arnold Ed. London, 2002.
20. Stiene-Martin EA, Steininger CAL & Koepke JA. **Clinical Hematology**. 2nd ed. Philadelphia, 1998.
21. Travers P, Hane Way Jr CA. **Imunobiologia**. 2^aed Artes Médicas, 1997.
22. Wintrobe MM, Lee GR, Boggs DR et al – **Clinical Hematology**. 12^aed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1996.