

Carta ao Editor / Letter to editor

Avaliação de Hb A₂ e Hb F em doadores de sangue de região malarígena da Amazônia Oriental brasileira por HPLC
Evaluation of Hb A₂ and Hb F by HPLC in blood donors from the malaria endemic region of Eastern Amazon of Brazil

Wanessa C. Souza¹Felipe R. Torres¹Ana R. Salvador¹Juvanete A. Távora³Ricardo L. D. Machado²Cláudia R. Bonini-Domingos¹

¹Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas – Departamento de Biologia – Unesp São José do Rio Preto- SP.

²Centro de Investigação de Microorganismos – Famerp – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – São José do Rio Preto-SP.

³Hemocentro do Amapá – Macapá-AP.

Senhor Editor,

Várias mutações genéticas têm sido descritas e sabe-se que muitas delas podem causar severas consequências no metabolismo dos seres humanos e, principalmente em populações formadas a partir de uma grande taxa de miscigenação.¹

Em muitas desordens das células vermelhas, incluindo as talassemias e variantes de hemoglobina, foram associados fatores relacionados à proteção de infecções parasitárias, como a malária, doença que chega a matar quase dois milhões de pessoas por ano em todo o mundo e no Brasil, com 99% dos casos concentrando-se na região Amazônica. Dessa forma, muitas pesquisas são desenvolvidas com o intuito de elucidar esses mecanismos.^{2,7} Alguns estudos indicam que o gene da talassemia pode conferir resistência contra a malária.² Tanto células vermelhas normais quanto anormais são suscetíveis à infecção pelo *Plasmodium falciparum*, porém alguns autores³ observaram que a

multiplicação parasitária pode ser significativamente reduzida em populações de células vermelhas talasêmicas. A hemoglobina C (Hb C), uma das variantes mais comuns, possui grande incidência no oeste da África que é coincidentemente uma região hiperendêmica de malária. O efeito protetor da Hb C ainda é desconhecido, porém já se sabe que o gene pode agir como um importante fator de seleção.⁴ Recentemente, Fairhurst et al demonstraram que algumas células infectadas pelo *Plasmodium falciparum* e homozigotas para a Hb C desenvolvem marcadores na superfície do eritrócito, afetando de alguma forma o desenvolvimento do antígeno, a ponto de comprometer o crescimento do parasita dentro da célula, o que conduziria à proteção contra a malária.⁵

Em regiões malarígenas da África, observou-se resistência à infecção pelo *Plasmodium* em crianças até os seis meses de vida, quando a hemoglobina fetal (Hb F) encontra-se com valores aumentados.⁴ Pesquisas realizadas na região de São José do Rio Preto relatam valores aumentados de Hb F em doadores de sangue.⁶ Outros trabalhos indicam que valores aumentados de hemoglobina A₂ (Hb A₂) e Hb F podem ser encontrados em portadores de Doença de Chagas e doadores de sangue com teste de “Machado & Guerreiro” positivo.⁷

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a concentração de Hb A₂ e Hb F em doadores de sangue provenientes de região malarígena do Brasil. Foram utilizadas amostras de 45 doadores de sangue do Hemocentro de Macapá-AP, de sexo, etnia e faixa etária variáveis, coletadas por punção intravenosa e acondicionadas em tubos com EDTA, após consentimento informado. Para a análise, utilizou-se a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) de troca iônica pelo Sistema VARIANT (Bio-Rad) com o uso do kit “b Thalassemia Short”,⁸ que fornece dados quantitativos da Hb A₂ e Hb F.

A HPLC apresenta sensibilidade e rapidez para a identificação das frações de Hb com quantificação e resultados precisos. Fornece também dados qualitativos das hemoglobinas variantes, mesmo que estas estejam presentes em pequenas quantidades, permitindo o diagnóstico de diferentes hemoglobinopatias.⁹

A média de Hb A₂ observada nas amostras analisadas, foi de 2,7%, e os valores mínimo e máximo, 2,3% e 3,1%, respectivamente. Não foi observado para este parâmetro variação dos valores de normalidade esperados para a população brasileira. Para a Hb F, a média observada foi de 0,8%, e os valores mínimo e máximo,

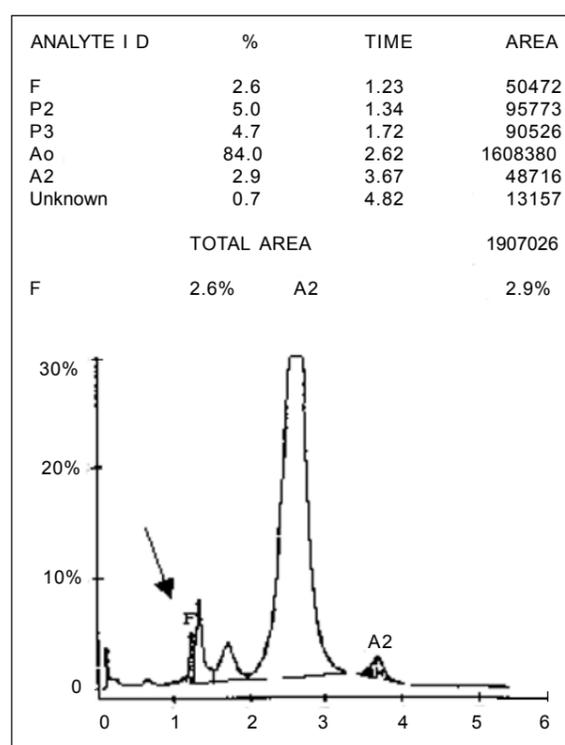


Fig. 1 – Cromatograma obtido pelo equipamento VARIANT-Bio-Rad. A seta ilustra a fração de Hb F aumentada

de 0,0% e 3,3%. Valores percentuais acima da faixa de normalidade foram observados em 14 (33,3%) das amostras analisadas.

A Figura 1 mostra um cromatograma com a fração de Hb F aumentada observada em uma das amostras e evidencia a sensibilidade do teste aplicado. A Figura 2 ilustra gráfico de distribuição de valores de Hb F e Hb A₂ obtidas por HPLC, em todas as amostras analisadas, revelando a presença dos valores acima da normalidade.

Alguns pesquisadores observaram alta concentração de Hb A₂ em indivíduos maláricos e constataram que o aumento desta fração hemoglobínica pode facilmente sugerir resultados falso-positivos para o diagnóstico de beta talassemia menor, já que a Hb A₂ representa um grande referencial para a confirmação dessa patologia.¹⁰ Existem relatos de que níveis aumentados de Hb F em células vermelhas infectadas pelo *Plasmodium falciparum* interferem no desenvolvimento do parasita.^{11,12} Observações in vitro descritas por alguns autores sugerem que a presença de Hb F gera uma certa proteção contra a malária por *P. falciparum*; neste caso, mesmo com aumento da invasão celular, o desenvolvimento do parasita é retardado.¹² Em camundongos

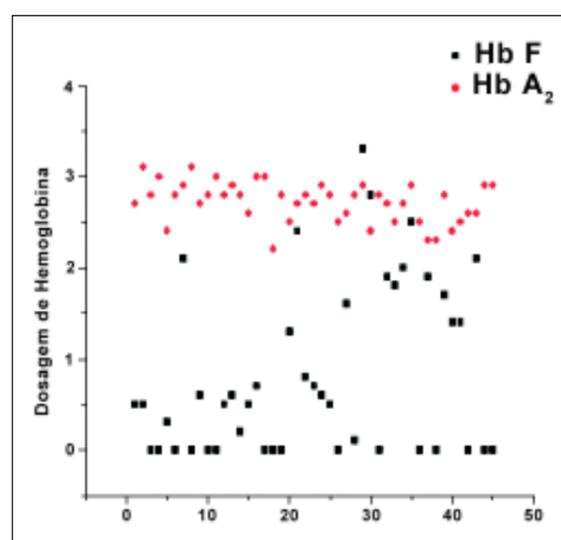


Fig. 2 – Gráfico da distribuição das valores percentuais de Hb F e Hb A₂, obtidas por HPLC com equipamento VARIANT - Bio-Rad

transgênicos, o comprometimento do crescimento do *Plasmodium* conduz a um declínio precoce da parasitemia, que pode estar associado à dificuldade do parasita em metabolizar hemoglobinas anormais,¹¹ e a presença de Hb F aumentada, nestas amostras analisadas, pode sugerir uma resistência à infecção. Os doadores relataram em entrevista prévia não apresentarem histórico de malária.

A metodologia utilizada no presente estudo apresentou-se eficiente na análise das frações hemoglobínicas e com facilidade na preparação das amostras. A automação tornou esta técnica um importante recurso para a rotina de diagnósticos das hemoglobinopatias na clínica laboratorial, evidenciando a sensibilidade dos valores de Hb F aumentada neste grupo.

Abstract

In malaria endemic regions of Africa, resistance to infection by Plasmodium has been observed in under 6-month-old children, when there are higher fetal hemoglobin (Hb F) levels. Research performed in the São José do Rio Preto region, central-east Brazil, reported increased levels of Hb F in blood donors. The purpose of this work was to evaluate the A₂ hemoglobin (Hb A₂) and Hb F concentrations in blood donors deriving from the Brazilian malaria endemic region. Forty-five blood donor samples from Macapá, from patients with varying genders, ages and ethnic origins, were collected by venous puncture after informed

consent was obtained. The samples were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) – System VARIANT (Bio-Rad). The HPLC demonstrated sensitivity and rapidity in the identification and measurement of the hemoglobins and gave precise results. Moreover, it provided measurement of hemoglobin variants, even when they were present in small amounts, providing a diagnosis of hemoglobinopathies. Hb F levels above the normal were observed in 33.3% of the analyzed samples. The presence of increased Hb F can suggest resistance to infection by *Plasmodium falciparum*, as there have been reports that infected red blood cells interfere in the development of the parasite.

Key words: Hemoglobins; malaria; genetic polymorphism; blood donors; Amazon region.

Referências Bibliográficas

- Zago MA, Silva Jr,WA, Franco RF. Hemoglobinopathies and other hereditary hematological diseases in the Brazilian population. *Pathology and Human-Parasite Interactions* 1999;51:227-34.
- Flint J et al. High frequencies of α -thalassemia are the result of natural selection of malaria. *Nature* 1986; 321:744-50.
- Pattanapanyasat K et al. Impairment of *Plasmodium falciparum* growth in thalassemia red blood cells: Further evidence by using biotin labeling na flow cytometry. *Blood* 1999;93:3.116-9.
- Guinet F et al. A comparison of the incidence of severe malaria in Malian children with normal and C-trait hemoglobin profiles. *Acta Tropica* 1997;68:175-182.
- Fairhurst RM et al. Aberrant development of *Plasmodium falciparum* in hemoglobin CC red cells: implications for the malaria protective effect of the homozygous state. *Blood* 2002;101:3.309-15.
- Zamaro PJA. Análise quantitativa e molecular de hemoglobina fetal em doadores de sangue. S J do Rio Preto, SP, 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Unesp.
- Bonini-Domingos CR. Prevalência de hemoglobinas anormais, fenótipos de haptoglobinas e quantificação de hemoglobinas A₂ e fetal em portadores de Doença de Chagas. S J do Rio Preto, SP, 1993. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Unesp.
- Bio-Rad – HPLC protocols.
- Chinelato-Fernandes, AR. Diferenciação molecular de mutantes de hemoglobinas humanas na população brasileira. São José do Rio Preto, SP, 2003. Tese (Doutoramento em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Unesp.
- Arends T. High concentrations of haemoglobin A₂ in malaria patients. *Nature* 1967;30:1.517-8.

- Shear HL et al. Transgenic mice expressing human fetal globin are protected from malaria by a novel mechanism. *Blood* 1998;92:2520-26.
- Pasvol G, Weatherall DJ, Wilson FJM. Effects of foetal haemoglobin on susceptibility of red cells to *Plasmodium falciparum*. *Nature* 1997;270:171.

Correspondência para: Wanessa Christina de Souza LHGDH - Departamento de Biologia – IBILCE-Unesp
Rua Cristóvão Colombo, 265.
15054-000. São José do Rio Preto, SP.
Fone: (17) 221-2392 – e-mail: wanejan@yahoo.com.br

Avaliação:

O tema abordado foi avaliado pelo editor.
Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 18/06/03

Aceito: 05/07/03

Abortamentos espontâneos em portadoras do Traço Falciforme (AS) *Spontaneous miscarriages among sickle cell trait carriers (AS)*

Antonio S. Ramalho

Iara D. Silva

Margareth Pagotti

Rosa C. Teixeira (in memoriam)

Departamento de Genética Médica
FCM – Unicamp – Campinas, SP
Núcleo de Genética da Prefeitura Municipal de Araras
Araras, SP

Senhor Editor,

Em carta ao editor da Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, a Professora Maria de Lourdes Pires do Nascimento, da ANEPA, Salvador, Bahia,¹ descreveu uma taxa significativamente maior de aborta-

mentos entre 14 mulheres com hemoglobina AS (78,6%) do que a observada entre 263 mulheres com hemoglobina AA (40,3%).

A pesquisadora também chamou a atenção para o fato de os seus resultados virem de encontro à nossa hipótese de que a maior proporção de gestações a termo de crianças AS, quando a mãe é AS e o pai AA, poderia ser resultante do abortamento preferencial de embriões AA.^{2,3} Concluindo a sua carta, a professora salienta a importância de outros estudos científicos para melhor elucidação desses fatos, tendo em vista a importância médico-social dos portadores da hemoglobina S.

Motivados por essa sugestão, julgamos relevante investigar a taxa de abortamentos espontâneos em mulheres atendidas nos Postos de Saúde de Araras, SP, em um programa de triagem voluntária de hemoglobinopatias desenvolvido pelo Núcleo de Genética daquele município.⁴

A taxa de abortamentos espontâneos observada entre 165 mulheres AS (17%) foi significativamente maior que a observada entre 500 mulheres AA (10%) ($p = 0,02$). Como a amostra incluía um grande número de mulheres jovens, com poucas gestações anteriores, reavaliamos os resultados, levando em consideração apenas as mulheres com mais de 20 anos de idade. Nesse caso, a taxa de abortamentos entre 112 mulheres AS (22%) diferiu de forma ainda mais significativa da observada entre 347 mulheres AA (12,6%) ($p = 0,01$).

Esses resultados concordam, portanto, com os observados por Nascimento,¹ embora as taxas de abortamentos observadas no nosso estudo tenham sido significativamente menores que as descritas na Bahia, tanto entre as mulheres AS, quanto entre as mulheres AA. Essa diferença pode ser atribuída à eventual diferença de nível socioeconômico entre as duas amostras populacionais, ou, o que é mais provável, à diferença de tamanho das amostras de mulheres AS examinadas nos dois trabalhos.

Tais achados realmente reforçam a hipótese da existência de um abortamento preferencial de embriões AA pelas mães AS. No entanto, essa hipótese só será confirmada quando for comprovado, por técnicas de Biologia Molecular, um excesso significativo de portadores do genótipo AA entre os embriões abortados espontaneamente pelas heterozigotas com o traço falciforme.

Até então, tanto os mecanismos pré-zigóticos, quanto os pós-zigóticos de desvio da proporção mendeliana esperada, devem ser considerados hipoteticamente na explicação do efeito materno por nós descrito.

Abstract

A study carried out in Salvador, Bahia, Northeastern Brazil, has shown a miscarriage rate significantly higher among AS women than that observed among AA controls. Considering this finding, we investigated the miscarriage rate among women cared for by the hemoglobinopathy program in the city of Araras, São Paulo, Southeastern Brazil. The spontaneous miscarriage rate among 165 AS women (17%) was significantly higher than that observed among 500 AA women (10%) ($p = 0.02$). Taking into account only women with ages above 20 years, the miscarriage rate among 112 heterozygous AS (22%) greatly differed from that observed among 347 AA women (12.6%) ($p = 0.01$). These results confirm the greater tendency of spontaneous miscarriages among AS women, which might be related to a previously described maternal effect in relation to AS heterozygous women.

Key words: Abortion rate, Sickle cell trait, Hemoglobinopathies

Referências Bibliográficas

1. Nascimento MLP. Abortos em mulheres portadoras de hemoglobina S. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia 2000;22:424
2. Duchovni-Silva I, Ramalho AS. Maternal segregation distortion in sickle cell and beta-thalassaemia traits? Lancet 1996;347:691-692.
3. Duchovni-Silva I, Ramalho AS. Evidence of maternal segregation distortion in the sickle cell and beta-thalassaemia traits. Journal of Medical Genetics 1996; 33:525.
4. Teixeira RC, Ramalho AS. Genetics and public health: response of a Brazilian population to an optional hemoglobinopathy program. Brazilian Journal Genetics 1994;17:435-438.

Correspondência para: Antonio Sérgio Ramalho
Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp
Caixa Postal 6111, 13081-970 – Campinas, SP
E-mail: dgmfcm@unicamp.br

Avaliação:

Editor e dois revisores externos

Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 24/09/2003

Aceito após modificações: 30/10/2003