

FERNANDO KRÜGNER

***NÍVEIS DOS RECEPTORES SOLÚVEIS DE TRANSFERRINA
E GRAUS DE MATURIDADE DOS RETICULÓCITOS NA
TALASSEMIA α^+***

CAMPINAS

2004

FERNANDO KRÜGNER

***NÍVEIS DOS RECEPTORES SOLÚVEIS DE TRANSFERRINA
E GRAUS DE MATURIDADE DOS RETICULÓCITOS NA
TALASSEMIA α^+***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para Obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas, Área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA DE FÁTIMA SONATI

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. HELENA Z W GROTTTO

CAMPINAS

2004

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

K939n Krügener, Fernando
Níveis dos receptores solúveis de transferrina e graus de maturidade dos reticulócitos na talassemia α^+ / Fernando Krügener. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientadores : Maria de Fátima Sonati, Helena Zerlotti Wolf Grotto
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Malária. I. Maria de Fátima Sonati. II. Helena Zerlotti Wolf Grotto. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria de Fátima Sonati

Membros:

1.

2.

3.

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data:

DEDICATÓRIA

*À meus pais Reynoldo (in memoriam) e Carmen,
por ter-me proporcionado tudo o que lhes foi
possível, aos meus irmãos Sandro e Letícia, e ao
meu sobrinho Vinícius.*

À Deus, primeiramente, por ter me dado forças para superar todos os obstáculos, e conseguir finalizar este trabalho.

As Profas. Dras. Maria de Fátima Sonati e Helena Z. W. Grotto, pela orientação e co-orientação, respectivamente, e pela oportunidade de aprendizagem e aprimoramento.

Aos colaboradores deste trabalho Tânia e Denise, e aos Profs. Drs. Fernando Ferreira Costa e Carmen Silvia Passos Lima.

Às funcionárias do Setor de Hemoglobinopatias, Elza e Sirley, pela grande ajuda na execução do trabalho. À todos os funcionários do Setor de Hematologia do Laboratório de Patologia Clínica, pela ajuda direta ou indireta, aos funcionários Davi e Dorival do Setor de Fisiologia, à Profa. Dra. Célia Regina Garlipp e ao funcionário Marco, do Setor de Líquidos Biológicos, por compartilhar de seus conhecimentos e equipamentos.

Às amigas do Laboratório Márcia, Denise, Daniela, Laudicéia, Ana Cristina e Margareth, pelo apoio e companheirismo.

À Andrea da Comissão de Pesquisa-Estatística – FCM e aos funcionários do Apoio Didático, Científico e Computacional – FCM – UNICAMP.

À FAPESP pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

À minha família, que sempre tem me apoiado, incentivado e ajudado na luta para alcançar as minhas conquistas.

Aos amigos do Laboratório de Análises Clínicas – HMCP – PUC e à todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

	PÁG.
RESUMO	<i>ix</i>
ABSTRACT	<i>xi</i>
1- INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1- A hemoglobina.....	14
1.2- Os genes das cadeias globínicas.....	16
1.3- Talassemias.....	17
1.3.1- Talassemias α	18
As Talassemias α^+	20
Fisiopatologia.....	21
Distribuição mundial da talassemia α^+	22
Talassemia α^+ e malária.....	23
Talassemia α^+ na população brasileira.....	25
1.4- Avaliação da atividade eritropoiética.....	25
2- OBJETIVOS	30
3- CAPÍTULO 1: “Reticulocyte count and maturation in α^+-Thalassemia”..	32
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS	46
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
6- ANEXOS	67

	PÁG.
Figura 1- Representação esquemática da molécula da Hb humana.....	14
Figura 2- Representação esquemática da ontogenia das cadeias globínicas....	15
Figura 3- Representação esquemática do <i>cluster</i> α , codificador de cadeias globínicas.....	16
Figura 4- Representação esquemática do <i>cluster</i> β , codificador de cadeias globínicas.....	16
Figura 5- Representação esquemática da estrutura dos genes de globina.....	17
Figura 6- Representação esquemática dos subsegmentos homólogos X, Y e Z dos genes das cadeias α da globina.....	20
Figura 7- Representação esquemática do pareamento incorreto dos cromossomos no subsegmento Z na talassemia α	21
Figura 8- Talassemia α e regiões endêmicas de malária.....	23
Figura 9- Representação esquemática do complexo [TfR-Tf-Fe] e TfR.....	27

LISTA DE QUADROS

	<i>PÁG.</i>
Quadro 1- Características clínicas e laboratoriais das talassemias α.....	19



RESUMO

Objetivo. Foi sugerido que, o aumento do número de células vermelhas (RBC) mais jovens na circulação em crianças α^+ -talassêmicas poderiam estar correlacionados com as altas frequências do alelo α^+ -talassêmico em regiões endêmicas de malária. A avaliação dos reticulócitos (RET) nessa condição, contudo, não tem sido realizada até o presente momento. Nosso objetivo foi determinar a contagem de RET circulantes e suas frações de maturidade, além do Receptor solúvel de Transferrina (sTfR) e dos níveis de eritropoietina sérica (s-Epo), em heterozigotos da talassemia α^+ da região Sudeste do Brasil, área não sujeita à ação da malária.

Material e Métodos. Foram estudados 121 portadores de talassemia α^+ ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) (T) e 249 controles normais ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) (C), sub-classificados de acordo com as seguintes faixas etárias: 1-5 anos (T=27;C=41), 6-10 (T=18;C=42), 11-15 (T=16;C=44), 16-20 (T=20;C=42) e maior de 20 (T=40;C=80), todos com níveis normais de Ferritina (FER). A análise dos RET foi feita utilizando citometria de fluxo, a determinação dos níveis de sTfR e s-Epo por imunonefelometria e quimioluminescência, respectivamente.

Resultados. Não houve nenhuma diferença estatística entre T e C na avaliação dos RET [porcentagens e valores absolutos, $p=0,2643$ e $0,5421$; nas frações de maturidade (alta, média e baixa), ($p=0,2579$, $0,2196$ e $0,4192$); e no Índice de Maturidade RET (RMI), $p=0,2471$, respectivamente], tão quanto nos níveis de s-Epo ($p=0,5711$). Os níveis de sTfR foram significativamente mais altos em T ($p=0,0001$) nos sub-grupos de 1-5 anos e maior de 20 ($p=0,0082$ e $0,0436$, respectivamente).

Conclusões. Embora os níveis de sTfR tenham sido mais altos, não foi observado qualquer alteração no número e maturação dos RET, nesses α^+ -talassêmicos aqui analisados, uma região livre de malária. Os resultados são compatíveis com uma eritropoiese compensatória.



ABSTRACT

Background and Objective. It has been suggested that an increased number of young circulating red blood cells (RBC) in α^+ -thalassemic children could be related to the high frequencies of the α^+ -thalassemic allele in malaria endemic areas. Reticulocyte (RET) evaluation in this condition, however, has not been performed so far. Our objective was to determine the RET number and maturation degree, in addition to the soluble transferrin receptor (sTfR) and serum erythropoietin (s-Epo) levels, in α^+ -thalassemia heterozygotes from Southeastern Brazil, an area not subjected to malaria.

Design and Methods. We studied 121 α^+ -thalassemia carriers ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) (T) and 249 normal controls ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) (C), sub-classified according to age [1-5 years (T=27;C=41), 6-10 (T=18;C=42), 11-15 (T=16;C=44), 16-20 (T=20;C=42) and over 20 (T=40;C=80)], all of them with normal ferritin levels. RET analyzes were performed by flow cytometry and the sTfR and s-Epo levels determined by immunonephelometry and chemiluminescence, respectively.

Results. There was no statistical difference between T and C regarding the RET evaluation [percentages and absolute values, $p=0.2643$ and 0.5421 ; high, medium and low maturation degree, $p=0.2579$, 0.2196 and 0.4192 ; RET Maturity Index (RMI), $p=0.2471$, respectively], as well as the s-Epo levels ($p=0.5711$). The sTfR concentrations were higher in T ($p=0.0001$), reaching statistical significance in the 1-5 and over 20 subgroups ($p=0.0082$ and 0.0436 , respectively).

Interpretation and Conclusions. Although the higher sTfR levels, we could not observe any alteration in RET number and maturation in the α^+ -thalassemic population analyzed here, a region free from malaria. These results are compatible with a compensatory erythropoiesis.



1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1- A HEMOGLOBINA

A hemoglobina (Hb), pigmento respiratório de todos os organismos vertebrados é uma proteína tetramérica, presente no interior das hemácias (RBC) e de seus precursores, que possui quatro cadeias globínicas: duas do tipo α (ζ ou α) e duas do tipo β (ϵ , γ , δ ou β) (BUNN e FORGET, 1986). Cada cadeia globínica liga-se a um grupo prostético heme, que consiste de um anel tetrapirrólico de protoporfirina IX, contendo um átomo central de ferro, no estado ferroso (Fe^{+2}), que se liga reversivelmente à molécula de O_2 , de forma que cada molécula de Hb pode transportar quatro moléculas de O_2 (BUNN e FORGET, 1986) (Figura 1).

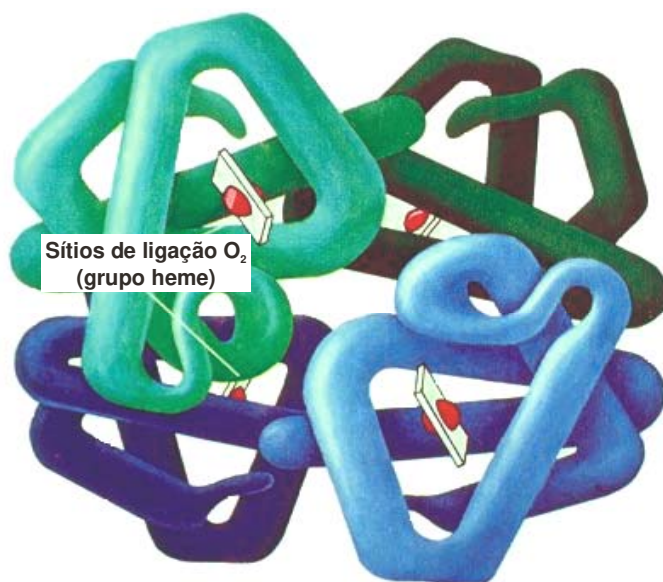


Figura 1- Representação esquemática da molécula da Hb humana

Para cada período de vida, há um tipo de Hb predominante, de acordo com as necessidades de O_2 do organismo; assim no período embrionário são encontradas as Hbs Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland ($\zeta_2\gamma_2$) (BUNN e FORGET, 1986; CHUI e WAYE, 1998). Com aproximadamente dez semanas de gestação, com o início do período fetal, elas começam a ser substituídas pela Hb Fetal ($\alpha_2\gamma_2$), a Hb F, que predomina até a

34^a. semana de gestação, quando então, o aumento da síntese das cadeias globínicas β começa a substituí-la e a Hb do adulto, a Hb A ($\alpha_2\beta_2$) vai gradativamente se tornando predominante (BUNN e FORGET, 1986; PALIS e SEGEL, 1998). Após o nascimento, a partir dos seis meses de vida, o indivíduo já possui as mesmas Hbs da vida adulta, sendo Hb A em torno de 95%, Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) até 3,5% e Hb F até 2% (BUNN e FORGET, 1986; CLARKE e HIGGINS, 2000) (Figura 2).

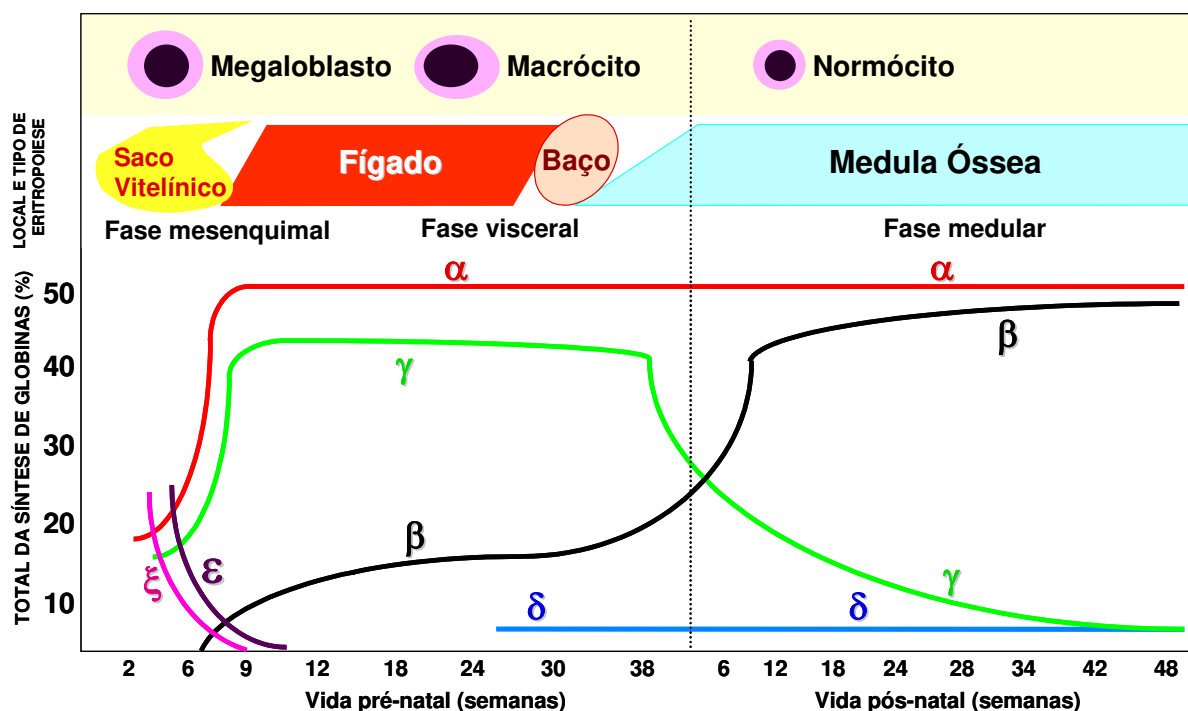


Figura 2- Representação esquemática da ontogenia das cadeias globínicas

1.2- OS GENES DAS CADEIAS GLOBÍNICAS

Os genes que codificam as cadeias globínicas estão agrupados em *clusters*, localizados em cromossomos diferentes. O *cluster* α está situado na extremidade do braço curto do cromossomo 16 (16p13.3), com os genes na mesma ordem em que são expressos durante os diversos períodos de vida: 5' - um gene embrionário ζ_2 , três pseudogenes $\psi\zeta_1$, $\psi\alpha_2$ e $\psi\alpha_1$, os genes duplicados α_2 e α_1 , e um gene de função ainda indeterminada θ_1 - 3' (PROUDFOOT e MANIATIS, 1980; HIGGS et al., 1989) (Figura 3).

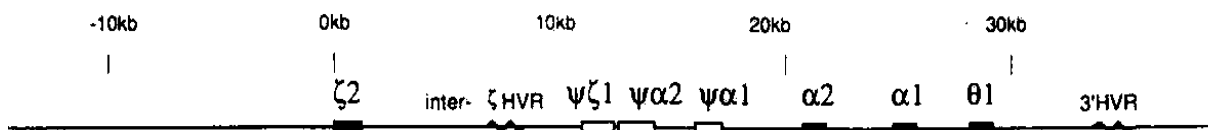


Figura 3- Representação esquemática do *cluster* α , codificador de cadeias globínicas

Os genes α_1 e α_2 são resultantes da duplicação de um gene ancestral, ocorrida há milhões de anos atrás, são altamente homólogos e codificam a mesma proteína (globina α), diferindo somente dentro do íntron 2 (IVS - *intervening sequence*) e suas regiões 3' não codificantes (MICHELSON e ORKIN, 1983; HIGGS et al., 1984). Apesar do gene α_2 codificar duas a três vezes mais proteína do que o gene α_1 , ambos são necessários para que ocorra a síntese equilibrada das cadeias globínicas (LIEBHABER et al., 1986).

O *cluster* β está localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5), também com os genes na mesma ordem em que são expressos: 5' - o gene embrionário ϵ , o gene fetal duplicado $G\gamma$ e $A\gamma$, um pseudogene $\psi\beta_1$, e os genes δ e β - 3' (BUNN e FORGET, 1986) (Figura 4).

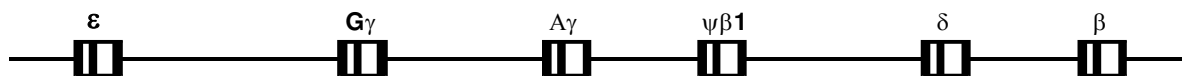


Figura 4- Representação esquemática do *cluster* β , codificador de cadeias globínicas

Todos os genes funcionais de globina possuem três éxons (seqüências codificadoras de proteína), separados por dois íntrons, que não são traduzidos em proteína (BUNN e FORGET, 1986) (Figura 5).

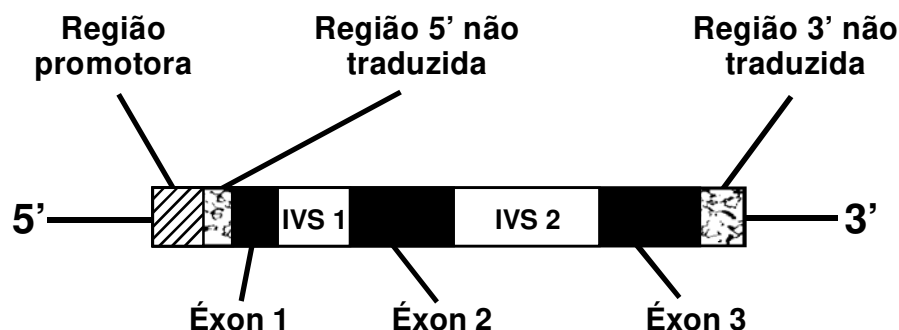


Figura 5- Representação esquemática da estrutura dos genes de globina

1.3- TALASSEMIAS

São um grupo heterogêneo de alterações hereditárias causadas por mutações que afetam os genes de globina, resultando em redução ou ausência de síntese de uma ou mais cadeias globínicas, o que pode levar à anemia, com microcitose (diminuição no tamanho das hemácias) e hipocromia (redução no conteúdo de Hb das hemácias) de intensidades variáveis, dependendo do grau de anemia (BUNN e FORGET, 1986; WEATHERALL et al., 2001). A relação entre a proporção de síntese de cadeias α e β , que normalmente está em torno de 1,0, fica prejudicada, com precipitação da cadeia excedente e conseqüente lesão da membrana celular (BIANCO et al., 1997). As talassemias são classificadas de acordo com o tipo de cadeia cuja produção está afetada, em talassemias α , β , δ , γ , $\delta\beta$, $\gamma\delta\beta$ e $\epsilon\gamma\delta\beta$ (BUNN e FORGET, 1986; WEATHERALL et al., 2001).

1.3.1- Talassemias α

As talassemias α ocorrem devido a mutações nos genes da globina α (genes α), que levam à redução ou ausência de síntese das cadeias α e conseqüente sobra das cadeias β . As hemácias α -talassêmicas contém quantidades excessivas de subunidades de Hb: no adulto, as cadeias β se tetramerizam (β_4), formando a Hb H, que é instável e precipita, lesando a membrana celular (BUNN e FORGET, 1986; KHUHAPINANT et al., 1994). No feto, a tetramerização das cadeias γ forma a Hb Bart's, que tem alta afinidade pelo O_2 , não o liberando para os tecidos, causando assim hipóxia tecidual e edema, que poderá resultar em morte fetal ou do recém-nascido (Hidropisia Fetal por Hb Bart's) (BUNN e FORGET, 1986; HOFFBRAND e PETTIT, 1995; CHUI e WAYE, 1998).

As talassemias α podem ser classificadas em α^0 , quando ocorre ausência total da síntese de cadeias α devido à ausência ou perda de função de ambos os genes α no genoma haplóide [$(--)$ ou $(\alpha\alpha)^T$, respectivamente], e α^+ , quando ocorre redução parcial da síntese de cadeias devido à ausência ou perda de função de um desses genes [$(-\alpha)$ ou $(\alpha^T\alpha)$ ou $\alpha\alpha^T$], respectivamente] (HIGGS et al., 1989; HARTEVELD et al., 1997). Ambas as formas podem ocorrer em homozigose ($--/--$) ou $(-\alpha/-\alpha)$, heterozigose ($--/\alpha\alpha$) ou $(-\alpha/\alpha\alpha)$ ou em interação ($--/-\alpha$) (BUNN e FORGET, 1986; STAMATOYANNOPOULOS et al., 2001). A talassemia α^0 resulta de grandes deleções que removem todo ou parte do *cluster* α ou de seu elemento regulatório (designado de α -MRE ou HS 40), deixando os genes α sem expressão; já a talassemia α^+ ocorre, mais freqüentemente, devido a pequenas deleções, que removem apenas um desses genes, embora também possa mais raramente ser causada por mutações de ponto ou deleções de poucos nucleotídeos (talassemias α não delecionais - α^T) (KATTAMIS et al., 1996; ORON-KAMI et al., 2000).

A distribuição geográfica da talassemia α^0 está limitada às regiões do Mediterrâneo (Itália e Grécia, principalmente) e também do Sudeste Asiático (China, Tailândia e Vietnã, principalmente) (BUNN e FORGET, 1986; STAMATOYANNOPOULOS et al., 2001). Já a talassemia α^+ tem distribuição mundial, com alta prevalência em todo o continente Africano, na região do Mediterrâneo, Oriente

Médio, Sudeste Asiático e Oceania, sendo que as mais elevadas frequências têm sido encontradas nas Ilhas do Sudoeste do Pacífico (HIGGS et al., 1989; WEATHERALL et al., 2001).

O Quadro 1 resume os possíveis genótipos α -talassêmicos e seus correspondentes aspectos clínicos e laboratoriais.

Quadro 1- Características clínicas e laboratoriais das talassemias α

Genótipo	Achados clínicos e laboratoriais
Talassemia α^+ heterozigótica $(-\alpha/\alpha \alpha)$ ou $(\alpha^T\alpha/\alpha\alpha)$	1 a 2% de Hb Bart's ao nascimento ou indetectável (50% dos casos) RBC: normocitose / normocromia ou discretas microcitose e hipocromia sem anemia no adulto
Talassemia α^+ homozigótica $(-\alpha/-\alpha)$ ou $(\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha)$	5 a 10% de Hb Bart's ao nascimento RBC: microcitose e hipocromia mais pronunciadas Anemia discreta, Hb 1-2 g/dl abaixo dos níveis normais em adulto
Talassemia α^0 Heterozigótica $(--/\alpha\alpha)$	Características similares aos da talassemia α^+ homozigótica
Talassemia α^0 homozigótica $(--/--)$	Cerca de 100% de Hb Bart's, traços de Hb H e Portland ao nascimento RBC: acentuadas anisopoiquilocitose, microcitose, hipocromia, macrocitose, policromatofilia (reticulocitose) e eritroblastos Morte fetal ou do recém nascido por Hidropisia Fetal
Interação $(--/-\alpha)$ ou $(--/\alpha^T\alpha)$	25 a 50% de Hb Bart's ao nascimento 5 a 30% de Hb H na vida adulta - Doença de Hb H Anemia hemolítica crônica (Hb 8 a 10 g/dl) RBC: moderadas microcitose, hipocromia, poiquilocitose e policromatofilia; presença de corpos de inclusão de Hb H

RBC: hemácias

As Talassemias α^+

O tipo mais comum de deleção na talassemia α^+ leva à perda de 3.7 kb de DNA à direita do gene α_2 ($-\alpha^{3.7}$, *rightward deletion*) (BUNN e FORGET, 1986; STAMATOYANNOPOULOS et al., 2001).

Os genes α_1 e α_2 estão presentes em duas regiões altamente homólogas de 4 kb cada (LAUER et al., 1980). Cada região é dividida em três subsegmentos homólogos, denominados X, Y e Z, separados por três segmentos não homólogos, denominados I, II e III. Os genes α_1 e α_2 estão inseridos nos subsegmentos Z (HIGGS et al., 1989) (Figura 6).

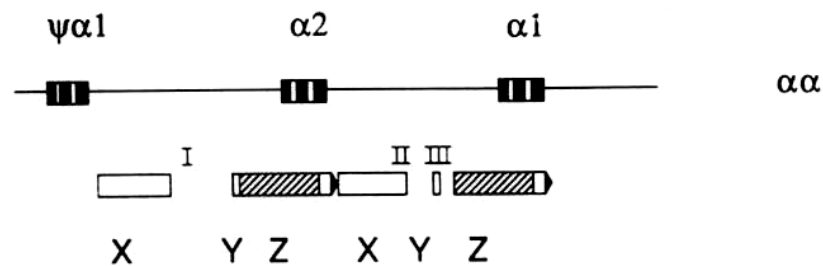


Figura 6- Representação esquemática dos subsegmentos homólogos X, Y e Z dos genes das cadeias α da globina

O alto grau de homologia entre os subsegmentos duplicados facilita o pareamento incorreto dos cromossomos durante a meiose, com conseqüente *crossing over* desigual que, se ocorrer no sub-segmento homólogo Z, levará à deleção de um gene α em um dos cromossomos ($-\alpha^{3.7}$) e à correspondente triplicação do gene no outro cromossomo 16 ($\alpha\alpha\alpha^{\text{anti-3.7}}$) (BUNN e FORGET, 1986; DODÉ et al., 1992) (Figura 7).

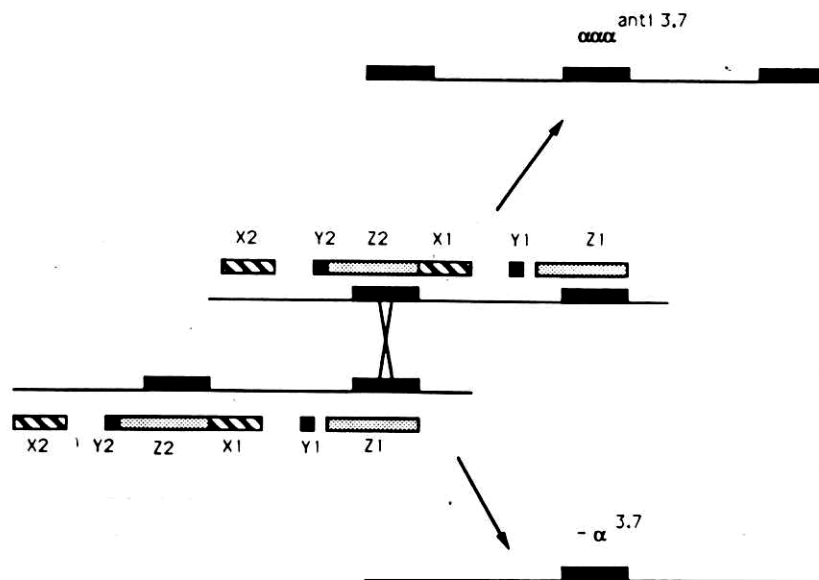


Figura 7- Representação esquemática do pareamento incorreto dos cromossomos no subsegmento Z na talassemia α

A deleção $-\alpha^{3.7}$ terá como resultado final a formação de um único gene híbrido $\alpha_2-\alpha_1$, que contém a porção inicial (5') do gene α_2 e a porção final (3') do gene α_1 (BUNN e FORGET, 1986; FOGLIETTA et al., 1996).

Fisiopatologia

A inativação de um gene α no genoma haplóide, na talassemia α^+ , provoca o desequilíbrio da relação de síntese das cadeias α e γ no período fetal, ocorrendo a tetramerização da cadeia globínica cuja síntese está preservada; assim, cadeias γ irão formar a Hb Bart's (γ_4), que irá desaparecer até os seis meses após o nascimento, sendo substituída pelo correspondente tetrâmero de cadeias β (β_4) - Hb H, que, sendo instável e pela pouca quantidade formada, é rapidamente proteolizado no interior das células, não sendo detectado na fase adulta (BUNN e FORGET, 1986; STAMATOYANNOPOULOS et al., 2001). Com isso, ocorre a redução da síntese de Hb no interior das hemácias, que podem

assim apresentar hipocromia e microcitose, pois é necessária a expressão dos quatro genes α para que ocorra a adequada hemoglobinizacão dos glóbulos (BUNN e FORGET, 1986; HARTEVELD et al., 1997; WILLIAMS et al., 2001).

Distribuição mundial da talassemia α^+

A talassemia α^+ tem sido considerada a alteracão genética mais comum e com distribuiçao praticamente mundial. Somente com o início da utilizacão das técnicas de análise de DNA é que foi possível identificar a sua correta distribuiçao e frequência em diferentes partes do mundo (STAMATOYANNOPOULOS et al., 2001).

As mais altas prevalências têm sido encontradas principalmente em regiões tropicais e subtropicais, onde pode chegar até a 80%, como nas populações da Ásia e Oceania (China, Tailândia, Indonésia, Malásia, Polinésia) (HILL et al., 1985; FUCHAROEN et al., 1988; WINICHAGOON et al., 1988; WU et al., 1988; ZENG et al., 1988; HUNDRIESER et al., 1990; SETIANINGSIH et al., 2003), nas Ilhas do Sudoeste do Pacífico (Papua Nova Guiné e Vanuatu, na Melanésia) (FLINT et al., 1986; ALLEN et al., 1997), e nas populações da região do Mediterrâneo (Itália e Grécia) (DI RIENZO et al., 1986; KANAVAKIS et al., 1986; TRAEGER-SYNODINOS et al., 1993; GALANELLO et al., 1998). No Oriente Médio (Arábia Saudita, Irã e Turquia), as prevalências chegam a 60% (OZSOYLU et al., 1982; ORON-KARNI et al., 2000; NEISHABURY et al., 2003). Essa forma de talassemia tem sido encontrada em praticamente todo o continente Africano, onde pode chegar à frequência de até 40% (ROUSSEAU et al., 1985; HENNI et al., 1987; ZORAI et al., 2002). Na América já foi relatada com incidência significativa em diversos países como Canadá, Estados Unidos, México, Caribe, Jamaica, Venezuela, Argentina e Brasil (HIGGS et al., 1981; JOHNSON et al., 1982; COSTA et al., 1989; SONATI et al., 1990; SONATI et al., 1991; SONATI et al., 1996; CASAS-CASTANEDA et al., 1998; VAN DER DIJS et al., 1999; ARENDS et al., 2000; WENNING et al., 2000; BORGES et al., 2001; WAYE et al., 2001; NOGUERA et al., 2002; SILVA et al., 2002; WENNING et al., 2002).

Talassemia α^+ e malária

A malária é uma infecção aguda, algumas vezes crônica, da corrente sanguínea, caracterizada clinicamente por febre, anemia e esplenomegalia, causada pelo parasita do gênero *Plasmodium* (P.), sendo que quatro espécies podem causar a malária humana: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale* (HENRY, 2001). As regiões endêmicas de malária incluem as zonas tropicais e temperadas, com a presença concomitante de várias espécies do parasita na mesma região (HENRY, 2001). As populações mais afetadas estão presentes na África, Ásia e Oceania, sendo que as principais complicações dessa patologia incluem uma anemia profunda (anemia severa malarial) e coma (malária cerebral) causadas pela espécie mais patogênica, o *P. falciparum* (GREENBERG et al., 2001).

Altas prevalências de portadores de talassemia α^+ , tanto homozigótica quanto heterozigótica, têm sido encontradas em regiões endêmicas de malária, evidenciando uma proteção seletiva e uma correlação direta entre essa forma de talassemia e a infecção pelo *Plasmodium* (FLINT et al., 1986; MOCKENHAUPT et al., 1999a) (Figura 8).

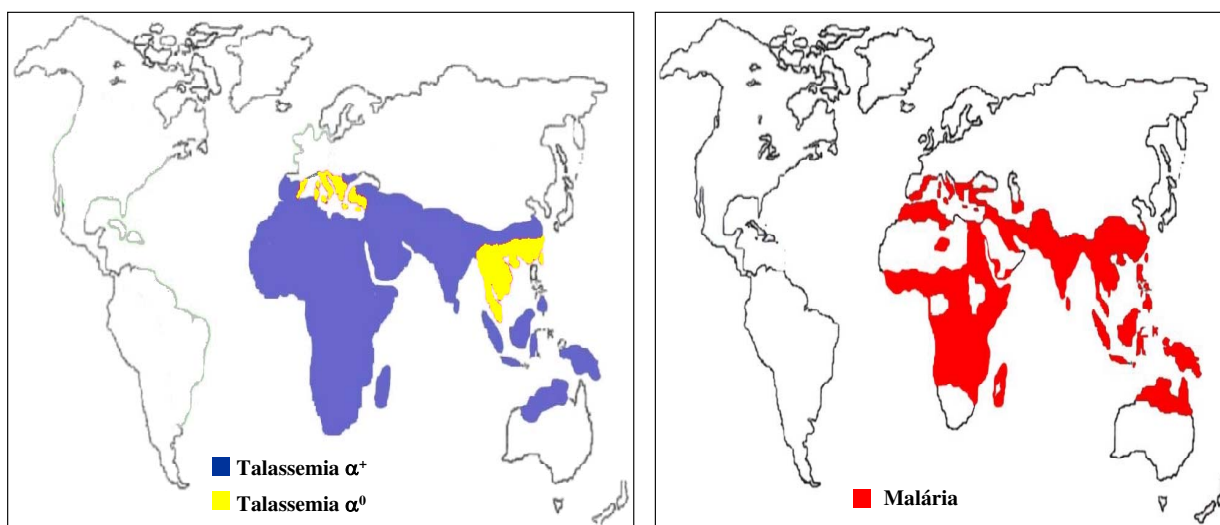


Figura 8- Talassemia α e regiões endêmicas de malária

Os mecanismos pelos quais a talassemia α^+ pode proteger seus portadores contra a malária causada pelo *P. falciparum*, ainda não estão elucidados (ALLEN et al., 1997; CHOTIVANICH et al., 2002). Estudos realizados em populações das Ilhas do Sudoeste do Pacífico (Vanuatu e Papua Nova Guiné, na Melanésia), regiões endêmicas de malária com presença concomitante do *P. vivax* e *P. falciparum* e elevada prevalência de talassemia α^+ (cerca de 70%) (FLINT et al., 1986), demonstraram que crianças α^+ -talassêmicas apresentam maior susceptibilidade à infecção pelo *P. vivax*, nos dois primeiros anos de vida, e adquirem maior resistência contra a infecção pelo *P. falciparum* quando mais velhas ou adultas (WILLIAMS et al., 1996). Como o *P. vivax* tem preferência por invadir reticulócitos (GALINSKI et al., 1992) e, como os níveis do Receptor solúvel de Transferrina (sTfR), proteína que reflete o grau de expansão da atividade eritróide na medula óssea, parecem estar aumentados nessas crianças, foi sugerida a possibilidade de que um certo grau de eritropoiese ineficaz na talassemia α^+ poderia resultar em uma maior quantidade de hemácias jovens circulantes no sangue periférico, o que levaria a uma maior susceptibilidade das crianças talassêmicas à infecção pelo *P. vivax* e posterior proteção contra o *P. falciparum*, justificando assim as elevadas frequências do alelo α^+ nessas regiões (REES et al., 1998). Dados sobre a contagem de reticulócitos e os níveis de eritropoietina circulante não estavam, no entanto, disponíveis.

A presença de eritropoiese ineficaz, que corresponde à morte dos precursores eritróides na medula óssea (WILLIAMS et al., 2001), é encontrada nas síndromes talassêmicas β , mas nunca anteriormente aventada na talassemia α^+ , pelas alterações hematológicas discretas a que ela corresponde. Por outro lado, um estudo realizado em uma população de crianças africanas, no Sudoeste da Nigéria, onde a malária também é endêmica e a talassemia α^+ atinge frequências bastante elevadas, não observou correlação entre o genótipo α^+ e os níveis de sTfR (MOCKENHAUPT et al., 1999b). Estes autores mostraram que, na malária crônica, às vezes detectada somente por técnicas moleculares, as concentrações de sTfR podem estar aumentadas, como resposta eritropoiética adequada à hemólise crônica (MOCKENHAUPT et al., 1999b).

Talassemia α^+ na população brasileira

Somente a partir da década de 80 foram publicados os primeiros trabalhos sobre a presença da talassemia α^+ na população brasileira, resultante, principalmente, como na maioria das populações mundialmente estudadas, da deleção $-\alpha^{3.7}$ (ZAGO et al., 1983 e 1985; COSTA et al., 1989; SONATI et al., 1990, 1991, 1992 e 1996; WENNING et al., 2000; BORGES et al., 2001; SILVA et al., 2002; WENNING et al., 2002). Estudos realizados na população negróide da região Sudeste brasileira estimaram uma prevalência de 22% da deleção $-\alpha^{3.7}$ heterozigótica ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) (SONATI et al., 1990 e 1991). Nesta mesma região do país, a frequência da deleção $-\alpha^{3.7}$ heterozigótica em pacientes com anemia falciforme também foi de 22% (COSTA et al., 1989); estudo em indivíduos com a presença concomitante de Hb C, a frequência da deleção $-\alpha^{3.7}$ foi de 18,1% na forma heterozigótica e de 2,0% na homozigótica (SILVA et al., 2002). Ao estudar a frequência da deleção $-\alpha^{3.7}$ em indivíduos com microcitose e hipocromia sem anemia, na região Sudeste brasileira, foram encontrados resultados de 36,9% em caucasóides e 57,1% em negróides, na forma heterozigótica, e 2,5% e 12,2% respectivamente, na forma homozigótica (BORGES et al., 2001).

A presença da deleção $-\alpha^{3.7}$ na população brasileira se deve ao elevado grau de miscigenação, sendo ela composta pelos nativos indígenas, pelos descendentes de povos africanos trazidos na época da colonização portuguesa, pelos descendentes de europeus que, em diferentes momentos históricos, participaram do processo de colonização ou que, para aqui imigraram, como os italianos, nos períodos pós-guerra, ou ainda, mais recentemente, pelos descendentes de povos asiáticos e do Oriente Médio que vieram em busca de trabalho e terra (ZAGO e COSTA, 1985).

1.4- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ERITROPOIÉTICA

No presente momento, existem duas novas metodologias para a avaliação da atividade eritropoiética: a contagem automatizada dos Reticulócitos (RET) e suas frações de maturidade, por citometria de fluxo fluorescente, e a determinação dos níveis séricos do Receptor solúvel de Transferrina (sTfR) (WATERS e SEAL, 2001).

Os RET são hemácias jovens contendo remanescentes de RNA ribossomal, que podem ser visualizados por corantes supravitais (azul de cresil brilhante, novo azul de metileno, azure B) (DACIE e LEWIS, 1995), e ainda são capazes de sintetizar Hb em seu interior; essas células possuem uma quantidade considerável de Receptores de Transferrina (TfR) em sua superfície, podendo assim captar mais ferro (Fe) para o seu interior (BRUGNARA, 2000).

A contagem manual de RET através de corantes supravitais não tem sido mais indicada nos laboratórios clínicos, dada sua grande imprecisão, pois pode apresentar um coeficiente de variação de até 50% (CORBERAND, 1996). A contagem automatizada utiliza como metodologia o princípio de que as células contendo RNA coradas por um fluorocromo (tiazol laranja, auramina O ou outros) podem ser quantificadas pela citometria de fluxo e classificadas de acordo com a intensidade de fluorescência emitida pela luz do laser de íon argônio (KHUHAPINANT et al., 1994; BRUGNARA, 2000). É possível assim dividir os RET em três categorias: RET *Low*, que apresenta baixa fluorescência, portanto alta maturidade, e corresponde à fração de maior quantidade no sangue periférico; RET *Medium*, que apresenta grau médio de fluorescência e maturidade intermediária; e RET *High*, que emite elevada fluorescência, sendo portanto de baixa maturidade e a fração em menor quantidade no sangue periférico (GONZALEZ et al., 1997). Outros dados também podem ser obtidos, como RET em valores absolutos e corrigidos pelo hematócrito (CRC – *Corrected RET Count*), o Volume Reticulocitário Médio (VRM) e ainda o RMI (*RET Maturity Index*), também chamado de MFI (*Mean Fluorescence Index*), que corresponde à soma das frações mais imaturas [$RMI = (RET\ High + RET\ Medium) \times 100 / RET\ Low$] (CHOI e PAI, 2001). A análise dos RET mais jovens pode ser utilizada, atualmente, como um dos parâmetros mais sensíveis para a avaliação da produção eritróide da medula óssea, sendo muito útil na avaliação e monitoramento após tratamento com reposição de ferro, administração de eritropoietina recombinante humana (rHuEPO) (BRUGNARA, 2000), quimioterapia ou transplante de medula óssea, pois quanto maior é o número de RET imaturos circulantes, tanto maior é a atividade eritropoiética da medula óssea (GONZALEZ et al., 1996; NORONHA et al., 2003).

O Receptor de Transferrina (TfR) consiste de uma glicoproteína transmembrana presente na superfície de vários tipos de células. É composto de dois monômeros com 760 aminoácidos (aa) e 95 kilodaltons (kDa) cada um, ligados por duas pontes dissulfeto nas posições 89 e 98 do aa cisteína, formando um dímero de 190 kDa (COOK et al., 1993). Cada monômero é dividido em três regiões: um domínio citoplasmático com 61 aa e 10 kDa, uma pequena região transmembrana com 28 aa e um grande domínio extra celular com 671 aa e 85 kDa (WIANES JÚNIOR et al., 2001a).

A molécula de Transferrina (Tf) contendo os átomos de ferro na forma férrica (Fe^{+3}) se liga ao TfR celular formando um complexo [TfR-Tf-Fe] (HUEBERS e FINCH, 1987) (Figura 9).

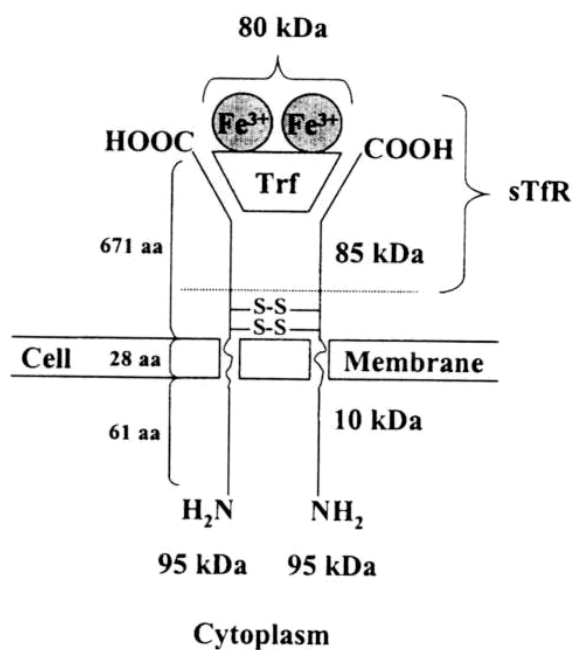


Figura 9- Representação esquemática do complexo [TfR-Tf-Fe] e TfR

Todas as células que necessitam de captação de Fe possuem TfR, mas em sua maioria, cerca de 80%, este receptor está sendo expresso na superfície dos precursores eritróides da medula óssea (WIANS JÚNIOR et al., 2001b), apresentando um número em cerca de 300.000 nos eritroblastos basófilos, acima de 800.000 nos eritroblastos policromáticos até cair para cerca de 100.000 nos RET e nenhum TfR nas hemácias maduras (R'ZIK et al., 2001). A regulação da expressão gênica do TfR é dependente de vários fatores, como a quantidade de Fe intracelular (HENTZE e KUHN, 1996) que, quando deficiente, resulta em um aumento da interação entre as proteínas reguladoras de Fe (IRP) com os elementos responsivos ao Fe (IRE) do RNA mensageiro (RNAm) do TfR, a nível pós-transcricional, intensificando a tradução do gene (HAILE, 1999; LOBMAYR et al., 2002; CAIRO et al., 2002); a eritropoietina (EPO) aumenta os níveis de expressão do RNAm do TfR, e assim a estimulação e proliferação dos progenitores eritróides na medula, por atuar na transcrição ou intensificar a ligação entre IRP com IRE (WEISS et al., 1997); e ainda a própria hipóxia, que aumenta a expressão do TfR devido a um elemento responsivo aos baixos níveis de O₂ presente no gene do TfR (TACCHINI et al., 1999; LOK e PONKA, 1999).

A quantidade de Fe na molécula de Tf exerce um importante papel na afinidade de ligação da Tf ao TfR (HUEBERS e FINCH, 1987), pois em pH fisiológico de 7,4 o complexo [TfR-Tf-Fe] é internalizado nos precursores eritróides através da formação de uma vesícula chamada endossomo, em um processo conhecido como endocitose (VAN DAM e STOORVOGEL, 2002). A queda do pH para 5,5 dentro do endossomo diminui a afinidade da Tf pelo Fe, que é então liberado para o citosol e vai para dentro das mitocôndrias, onde é utilizado para a síntese do heme e da Hb, ou permanece estocado na forma de ferritina (PONKA et al., 1998). A apotransferrina ligada ao TfR é reciclada de volta para a superfície da célula, de onde então o complexo se dissocia para a realização de outros ciclos de captação do Fe (HUEBERS e FINCH, 1987).

Somente em 1986, a presença da forma solúvel do TfR no soro humano, denominado sTfR, foi detectada (KOHGO et al., 1986). O sTfR é liberado das células eritróides através de clivagem proteolítica, que ocorre entre Arg100-Leu101 do domínio extracelular do TfR (BAYNES, 1996), resultando em um monômero truncado e solúvel de

aproximadamente 74 kDa, que circula no sangue ligado à transferrina (ALLEN et al., 1998). Os níveis do sTfR são diretamente proporcionais à quantidade total do TfR celular; como a maior quantidade destes está presente nos precursores eritróides (BRITTENHAM et al., 2000), o sTfR é uma maneira indireta de se avaliar o grau de atividade eritropoiética (KUIPER-KRAMER et al., 1998; CAZZOLA et al., 1999; COTTON et al., 2000), tanto nas doenças hipoproliferativas quanto hiperproliferativas da medula eritróide (HUEBERS et al., 1990; KHUMALO et al., 1998; WORWOOD, 2002), após tratamento com quimioterapia (KIM et al., 2002) ou administração de rHuEPO (SHARPE et al., 2002; BEGUIN, 2003). É também muito útil e preciso na avaliação do *status* de Fe (VERNET e DOYEN, 2000; JOOSTEN et al., 2002), no diagnóstico da anemia ferropriva (SKIKNE et al., 1990; MAST et al., 1998; MALOPE et al., 2001), e na diferenciação desta com as anemias de doenças crônicas (WIANS JÚNIOR et al., 2001b; BEERENHOUT et al., 2002; LEE et al., 2002; THOMAS e THOMAS, 2002).

Altas concentrações do sTfR são observadas em doenças com atividade eritropoiética medular aumentada, como na anemia hemolítica auto-imune, esferocitose hereditária, talassemia β /Hb E, doença de Hb H, anemia falciforme e policitemia vera (HUEBERS et al., 1990; WORWOOD, 2002), e baixas concentrações em doenças com diminuída atividade eritropoiética medular, como na anemia aplástica e doença renal crônica (WORWOOD, 2002; BEGUIN, 2003).



2- OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade eritropoiética na talassemia α^+ heterozigótica, em uma população da região Sudeste brasileira, área não sujeita à ação da malária, com o intuito maior de verificar se algum grau de reticulocitose pode ser observado nessa condição, que possa sugerir um mecanismo de proteção contra a malária.



3- CAPÍTULO 1

“RETICULOCYTE COUNT AND MATURITY IN α^+ -THALASSEMIA”

Submetido no periódico Haematologica

RETICULOCYTE COUNT AND MATURITY IN α^+ -THALASSEMIA

FERNANDO KRÜGNER¹, TANIA R ZACCARIOTTO¹, ENDRIGO T. ROSIM¹,
FERNANDO F COSTA², HELENA Z W GROTTTO¹, MARIA F SONATI¹.

¹Department of Clinical Pathology, ²Department of Clinical Medicine, School of Medical Sciences – State University of Campinas - UNICAMP, 13083-970-Campinas (SP), Brazil.

running title: α^+ -thalassemia: reticulocyte evaluation.

Acknowledgments

This work was supported by FAPESP (grant no. 01/00763-7), Brazil. We are grateful to Ms. Elza M. Kimura, Sirley A. Gervásio and Denise M. Oliveira of the Clinical Pathology Department-UNICAMP, for technical help, to Mrs. Andrea F. Semolini of the Statistics Committee of the School of Medical Sciences – UNICAMP, for statistical analyses, and to Dr. Nicola Conran of Hemocentro-UNICAMP, for the English review of this manuscript.

Correspondence

Maria de Fátima Sonati

Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences – State University of Campinas - UNICAMP

P.O. Box: 6111 – Campinas, SP, Brazil

Zip Code: 13083-970

Phone: +55-19-3788-9451

Fax: +55-19-3788-9434

e-mail: sonati@fcm.unicamp.br

Key words: α -thalassemia, reticulocyte, soluble transferrin receptor, serum erythropoietin, Brazilian population.

Authors' addresses

Fernando Krüger

Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences – State University of
Campinas - UNICAMP

P.O. Box: 6111 – Campinas, SP, Brazil

Zip Code: 13083-970

Phone: +55-19-3788-9453

Fax: +55-19-3788-9434

e-mail: fernando@fcm.unicamp.br

Tania Regina Zaccariotto

Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences – State University of
Campinas - UNICAMP

P.O. Box: 6111 – Campinas, SP, Brazil

Zip code: 13083-970

Phone: +55-19-3788-9453

Fax: +55-19-3788-9434

e-mail: taniabio@fcm.unicamp.br

Endrigo Torezan Rosim

Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences – State University of
Campinas - UNICAMP

P.O. Box: 6111 – Campinas, SP, Brazil

Zip Code: 13083-970

Phone: +55-19-3788-9453

Fax: +55-19-3788-9434

e-mail: rosim@bol.com.br

Fernando Ferreira Costa

Department of Clinical Medicine, School of Medical Sciences – State University of
Campinas-UNICAMP

P.O. Box: 6198 – Campinas, SP, Brazil

Zip Code: 13083-970

Phone: +55-19-3788-8734

Fax: +55-19-3289-1089

e-mail: ferreira@unicamp.br

Helena Zerlotti Wolf Grotto

Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences – State University of
Campinas - UNICAMP

P.O. Box: 6111 – Campinas, SP, Brazil

Zip Code: 13083-970

Phone: +55-19-3788-7064

Fax: +55-19-3788-9434

e-mail: grotto@fcm.unicamp.br

Abstract

Background and Objective. It has been suggested that an increased number of young circulating red blood cells (RBC) in α^+ -thalassemic children could be related to the high frequencies of the α^+ -thalassemic allele in malaria endemic areas. Reticulocyte (RET) evaluation in this condition, however, has not been performed so far. Our objective was to determine the RET number and maturation degree, in addition to the soluble transferrin receptor (sTfR) and serum erythropoietin (s-Epo) levels, in α^+ -thalassemia heterozygotes from Southeastern Brazil, an area not subjected to malaria.

Design and Methods. We studied 121 α^+ -thalassemia carriers ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) (T) and 249 normal controls ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) (C), sub-classified according to age [1-5 years (T=27;C=41), 6-10 (T=18;C=42), 11-15 (T=16;C=44), 16-20 (T=20;C=42) and over 20 (T=40;C=80)], all of them with normal ferritin levels. RET analyzes were performed by flow cytometry and the sTfR and s-Epo levels determined by immunonephelometry and chemiluminescence, respectively.

Results. There was no statistical difference between T and C regarding the RET evaluation [percentages and absolute values, $p=0.2643$ and 0.5421 ; high, medium and low maturation degree, $p=0.2579$, 0.2196 and 0.4192 ; RET Maturity Index (RMI), $p=0.2471$, respectively], as well as the s-Epo levels ($p=0.5711$). The sTfR concentrations were higher in T ($p=0.0001$), reaching statistical significance in the 1-5 and over 20 subgroups ($p=0.0082$ and 0.0436 , respectively).

Interpretation and Conclusions. Although the higher sTfR levels, we could not observe any alteration in RET number and maturation in the α^+ -thalassemic population analyzed here, a region free from malaria. These results are compatible with a compensated erythropoiesis.

Introduction

Alpha⁺-thalassemia (α^+ -thal) is mainly caused by deletions affecting one of the two α -globin genes in the haploid genome, resulting in deficient synthesis of α -globin chain with a small degree of globin chain imbalance (1). The heterozygotes ($-\alpha/\alpha\alpha$) are asymptomatic, presenting either normal hematological features or a slight degree of microcytosis and hypochromia, with normal hemoglobin (Hb) levels (2). The $-\alpha^{3.7}$ rightward deletion accounts for the majority of the cases all over the world (3). In malaria endemic areas, the α^+ -thalassemic alleles reach frequencies as high as 70%. Thus, it is believed that these alleles are kept at such frequencies by protecting the carriers against malaria (4-5). The mechanisms involved in this phenomenon are, however, still not established. Williams et al., in 1996 (6), observed an increased susceptibility to malaria in α -thalassemic children during their first two years of life, which could lead them to develop some immunological protection against the infection when older and adults. As it has been showed that the *Plasmodium (P.) falciparum* has a preference for younger red blood cells (RBC) and *P. vivax* only infects reticulocytes - RET (7-8), an increased number of young circulating RBC in α^+ -thalassemic children could be associated with the positive selection of malaria on this hemoglobinopathy (9). Assessing erythropoietic activity by measuring the soluble transferrin receptor (sTfR) concentrations, Rees et al. (9) described increased levels of this protein in α^+ -thalassemic children from the Pacific Island of Santo, Vanuatu, a malaria endemic area with concomitant infection by *P. vivax* and *P. falciparum*. Different results were obtained by Mockenhaupt et al., in 1999 (10), who did not find a correlation between α -genotypes and sTfR levels in a population of African children in Southwestern Nigeria, where malaria falciparum is endemic and α^+ -thal very frequent. These authors also showed that, in such areas, the sTfR concentrations may be influenced by asymptomatic and mild *P.falciparum* infection, sometimes only detected by PCR. Reticulocyte evaluation could contribute to a better understanding of the erythropoiesis in α^+ -thalassemia but, as far as we know, it has been poorly investigated in this condition. The only study employing flow cytometry and including 2 cases of α -thal 1 trait showed no difference between thalassemics and normal controls (11).

In Brazil, the $-\alpha^{3.7}$ deletion is very common, occurring in about 25% of the African descended population and also affecting, in minor proportion, the Caucasian population (12-13). The aim of the present study was to evaluate the circulating RET number and maturational stages in α^+ -thal heterozygotes, not subjected to malaria infection, classified according to age and compared to normal α -genotype control groups. The sTfR and serum erythropoietin (s-Epo) levels were also analyzed to complement erythropoiesis evaluation.

Design and Methods

Subjects

A total of 121 α^+ -carriers ($-\alpha/\alpha\alpha$) (T) and 249 normal controls ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) (C), sub-classified according to age as 1-5 years [T=27, 15 men (m)/12 women (w); C=41, 16 m/25 w], 6-10 (T=18, 11 m/7 w; C=42, 19m/23w), 11-15 (T=16, 6m/10w; C=44, 15m/29w), 16-20 (T=20, 6m/14w; C=42, 12m/30w) and over 20 years (T=40, 11m/29w; C=80, 40m/40w), were analyzed. Individuals were selected from a population in the Southeastern region of Brazil, an area not subjected to malaria. All subjects presented normal ferritin (FER) levels, according to each age group.

The Research and Ethics Committee of the School of Medical Sciences approved the study and an informed consent was obtained from each volunteer or her/his legal guardian.

Methods

Peripheral blood samples were collected with EDTA and without anticoagulant; hematological parameters and RET counts and maturity fractions were determined by automated cell counter (Pentra 120 Retic, ABX Diagnostics, Montpellier, France), using flow cytometry and thiazole orange dye. The RET maturation classes depend on their RNA

content and corresponding fluorescent intensity (low, medium and high: the most immature RET fraction corresponds to the highest degree of fluorescence) (14). The RET Maturity Index (RMI)=[(High + Medium fluorescence fractions) x 100/ Low fluorescence fraction] represents the immature RET fraction, which corresponds to the young prematurely released RET, and can be used as one of the earliest and most sensitive predictors of erythropoietic activity (15).

Hb analyses were carried out by cation-exchange High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using a Bio-Rad Variant II Analyzer (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Hemoglobin structural alterations and β -thalassemia trait were excluded.

DNA samples were extracted from peripheral blood leukocytes by GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) and the $-\alpha^{3.7}$ deletion investigated by PCR according to Dodé et al. (16).

The sTfR levels were determined by immunonephelometry (N Latex sTfR nephelometric kit, Dade Behring, Brussels, Belgium) and FER and s-Epo by chemiluminescent immunometric assay (Immulite, Diagnostic Products Co., Los Angeles, CA, USA), following the manufacturer's instructions.

Statistical analyses were conducted using the Statistical Analysis System, 8.02 for Windows, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. The Rank Transformation ANOVA and Tukey tests were used to compare the groups (17). All $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Regarding the hematological parameters, as expected, the means of the RBC counts and of the Red Cell Distribution Width (RDW) values in the T group were significantly higher than those observed in the C group ($p=0.0001$ for both of them), while the means of the Hb, Mean Cell Volume (MCV) and Mean Cell Hemoglobin (MCH) values

were lower ($p=0.0001$ for all of them). The means of the Hematocrit (Hct) values did not show any significant difference ($p=0.3376$) (Table 1).

The medians of the RET percentages (%) and absolute values (#) also did not differ between T and C ($p=0.2643$ and 0.5421 , respectively), as well as the RET low, medium and high maturity fractions ($p=0.4192$, 0.2196 and 0.2579 , respectively) and the RMI ($p=0.2471$). These data are demonstrated in Table 2.

The s-Epo levels were found to be all within the reference ranges and did not differ between T and C ($p=0.5711$). The only significant difference was found in the comparison of the sTfR concentrations: the medians were higher in the T group ($p=0.0001$), and statistical significance was observed in only the 1-5 and over 20 years age subgroups ($p=0.0082$ and 0.0436 , respectively). These data are presented in Table 3, where we also included the FER values.

Discussion

sTfR levels have been considered the most reliable tool for assessing erythropoietic activity when iron deficiency and chronic malaria are excluded, being proportional to the mass of erythroid tissue (18). In the population studied here, the median values were higher in the thalassemic subgroups compared to the normal controls, but statistical significance was observed only in the 1-5 years and over 20 years subgroups. These increases were not concomitant neither with detectable elevation of the s-Epo levels, one of the most important regulatory factors of TfR expression in erythroid cells in addition to iron status (19), nor with a rise in the ferritin levels.

Conversely, the RET counts and maturity fractions, as well as the RMI, did not show any significant difference between the T and C groups, in any age subgroup.

Thus, for the α^+ -thal carriers investigated here, in a region free of malaria, data are compatible with the occurrence of a discreet expansion of the erythron, mainly reflecting the erythroblast mass (19), which probably occurs to compensate microcytosis and

hypochromia. Reticulocytosis or abnormal maturation of reticulocytes was not found. The highest sTfR increase, observed in the 1-5 years age subgroup, may be due to a higher physiological demand during childhood (20).

References

1. Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM, Varmus H. The molecular bases of blood diseases, 3rd. ed. Sounder Company, Philadelphia, 2001.
2. Galanello R, Sollaino C, Paglietti E, Barella S, Perra C, Doneddu I et al. α -Thalassemia carrier identification by DNA analysis in the screening for Thalassemia. American Journal of Hematology 1998; 59:273-8.
3. Weatherall DJ, Clegg JB, Gibbons R, Higgs DR, Old JM, Olivieri NF et al. The Thalassemia Syndromes, 4th edn, Blackwell Science, Oxford, 2001.
4. Flint J, Hill AVS, Bowden DK, Oppenheimer SJ, Sill PR, Serjeantson SW et al. High frequencies of α -thalassaemia are the result of natural selection by malaria. Nature 1986; 321:744-50.
5. Allen SJ, O'Donnell AO, Alexander NDE, Alpers MP, Peto TEA, Clegg JB et al. α^+ -thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1997; 94:14736-41.
6. Williams TN, Maitland K, Bennett S, Ganczakowski M, Peto TEA, Newbold CI et al. High incidence of malaria in alpha-thalassaemia children. Nature 1996; 383:522-5.
7. Pasvol G, Weatherall DJ & Wilson RJ. The increased susceptibility of young red cells to invasion by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. British Journal of Haematology 1980; 45:285-95.

8. Galinski M, Medina C, Ingravallo P & Barnwell J. A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. *Cell* 1992; 69:1213-26.
9. Rees DC, Williams TN, Maitland K, Clegg JB & Weatherall DJ. Alpha thalassaemia is associated with increased soluble transferrin receptor levels. *British Journal of Haematology* 1998; 103:365-9.
10. Mockenhaupt FP, May J, Stark K, Falusi AG, Meyer CG, Bienzle U. Serum transferrin receptor levels are increased in asymptomatic and mild *Plasmodium falciparum*-infection. *Haematologica* 1999; 84:869-73.
11. Khuhapinant A, Bunyaratvej, A, Tatsumi N, Pribwai M, Fucharoen S. Number and maturation of reticulocytes in various genotypes of thalassemia as assessed by flow cytometry. *Acta Haematol* 1994; 91:119-125.
12. Sonati MF, Farah SB, Ramalho AS, Costa FF. High prevalence of α -thalassemia in a Black population of Brazil. *Hemoglobin* 1991; 15:309-11.
13. Borges E, Wenning MRSC, Kimura EM, Gervásio SA, Costa FF, Sonati MF. High prevalence of α -thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34(6):759-62.
14. Brugnara C. Reticulocyte cellular indices: a new approach in the diagnosis of anemias and monitoring of erythropoietic function. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2000; 37(2):93-130.
15. Choi JW, Pai SH. Reticulocyte subpopulations and Reticulocyte Maturity Index (RMI) rise as body iron status falls. *American Journal of Hematology* 2001; 67:130-5.
16. Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochette J. Rapid analysis of $-\alpha^{3.7}$ thalassaemia and $\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$ triplication by enzymatic amplification analysis. *British Journal of Haematology* 1992; 82:105-11.
17. Montgomery DC. Design and Analysis of Experiments. New York; John Wiley & Sons, 1991; 3rd ed.

18. Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clinica Chimica Acta* 2003; 329:9-22.
19. R'zik S, Loo M, Beguin Y. Reticulocyte transferrin receptor (TfR) expression and contribution to soluble TfR levels. *Haematologica* 2001; 86:244-51.
20. López MA, Morales AC, Vico JM, Lloens RM, Bonachera MDC, Muñoz JL et al. Receptor sérico de la transferrina en niños sanos. *Anales Españoles de Pediatría* 2001; 55:113-20.

Table 1: Red Blood Cell Parameters

Parameter	Age Groups	THALASSEMICS			CONTROLS			p
		n	Mean $\pm$ SD		n	Mean $\pm$ SD		
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	1 to 5	27	4.92 $\pm$ 0.49		41	4.64 $\pm$ 0.38		0.0001
	6 to 10	18	5.00 $\pm$ 0.32		42	4.69 $\pm$ 0.36		
	11 to 15	16	5.05 $\pm$ 0.43		44	4.64 $\pm$ 0.32		
	16 to 20	20	5.16 $\pm$ 0.51		42	4.76 $\pm$ 0.38		
	> 20	40	5.34 $\pm$ 0.44		80	4.82 $\pm$ 0.40		
Hb (g/dL)	1 to 5	27	12.08 $\pm$ 1.05		41	12.75 $\pm$ 1.00		0.0001
	6 to 10	18	12.89 $\pm$ 0.82		42	13.30 $\pm$ 0.93		
	11 to 15	16	13.40 $\pm$ 1.05		44	13.63 $\pm$ 0.92		
	16 to 20	20	13.50 $\pm$ 0.97		42	14.10 $\pm$ 1.06		
	> 20	40	13.70 $\pm$ 1.22		80	14.52 $\pm$ 1.08		
HCT (%)	1 to 5	27	37.23 $\pm$ 3.21		41	37.62 $\pm$ 2.99		0.3376
	6 to 10	18	39.38 $\pm$ 2.50		42	39.07 $\pm$ 2.73		
	11 to 15	16	40.76 $\pm$ 3.28		44	40.55 $\pm$ 2.49		
	16 to 20	20	41.23 $\pm$ 3.19		42	41.84 $\pm$ 2.95		
	> 20	40	42.35 $\pm$ 3.66		80	43.01 $\pm$ 2.88		
MCV (fL)	1 to 5	27	76.10 $\pm$ 6.33		41	80.98 $\pm$ 4.19		0.0001
	6 to 10	18	78.89 $\pm$ 3.48		42	83.44 $\pm$ 3.71		
	11 to 15	16	80.86 $\pm$ 4.06		44	87.44 $\pm$ 3.78		
	16 to 20	20	80.34 $\pm$ 5.53		42	87.96 $\pm$ 3.92		
	> 20	40	79.22 $\pm$ 3.56		80	89.44 $\pm$ 3.54		
MCH (pg)	1 to 5	27	24.70 $\pm$ 2.32		41	27.43 $\pm$ 1.57		0.0001
	6 to 10	18	25.81 $\pm$ 1.14		42	28.41 $\pm$ 1.44		
	11 to 15	16	26.56 $\pm$ 1.07		44	29.38 $\pm$ 1.37		
	16 to 20	20	26.28 $\pm$ 1.94		42	29.64 $\pm$ 1.31		
	> 20	40	25.66 $\pm$ 1.32		80	30.18 $\pm$ 1.27		
RDW	1 to 5	27	16.03 $\pm$ 3.13		41	14.01 $\pm$ 1.14		0.0001
	6 to 10	18	13.76 $\pm$ 0.71		42	13.58 $\pm$ 1.10		
	11 to 15	16	14.05 $\pm$ 1.38		44	13.51 $\pm$ 1.07		
	16 to 20	20	15.13 $\pm$ 2.72		42	13.80 $\pm$ 0.88		
	> 20	40	16.19 $\pm$ 1.51		80	14.21 $\pm$ 1.23		

RBC: Red Blood Cell; Hb: hemoglobin; HCT: hematocrit; MCV: Mean Cell Volume;

MCH: Mean Cell Hemoglobin; RDW: Red Cell Distribution Width

Table 2: Reticulocyte analyses

Parameter	Age Groups	THALASSEMICS n Median $\pm$ SD	CONTROLS n Median $\pm$ SD	p
RET (%)	1 to 5	27 1.39 $\pm$ 0.46	41 1.34 $\pm$ 0.46	0.2643
	6 to 10	18 1.26 $\pm$ 0.30	42 1.35 $\pm$ 0.43	
	11 to 15	16 1.10 $\pm$ 0.59	44 1.26 $\pm$ 0.41	
	16 to 20	20 1.08 $\pm$ 0.61	42 1.25 $\pm$ 0.40	
	> 20	40 0.96 $\pm$ 0.60	80 1.20 $\pm$ 0.51	
RET# ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1 to 5	27 62.80 $\pm$ 19.40	41 64.40 $\pm$ 22.70	0.5421
	6 to 10	18 64.10 $\pm$ 18.10	42 62.90 $\pm$ 21.30	
	11 to 15	16 59.30 $\pm$ 27.50	44 58.90 $\pm$ 18.50	
	16 to 20	20 58.30 $\pm$ 30.00	42 59.40 $\pm$ 19.10	
	> 20	40 54.80 $\pm$ 30.10	80 59.20 $\pm$ 24.60	
RET Higher maturity (%)	1 to 5	27 89.70 $\pm$ 6.34	41 90.30 $\pm$ 5.14	0.2579
	6 to 10	18 91.00 $\pm$ 3.92	42 90.20 $\pm$ 5.07	
	11 to 15	16 92.85 $\pm$ 5.26	44 91.95 $\pm$ 5.30	
	16 to 20	20 90.65 $\pm$ 6.50	42 91.50 $\pm$ 5.88	
	> 20	40 92.95 $\pm$ 6.34	80 89.10 $\pm$ 7.01	
RET Medium maturity (%)	1 to 5	27 8.58 $\pm$ 4.67	41 8.21 $\pm$ 3.88	0.2196
	6 to 10	18 6.54 $\pm$ 3.07	42 8.12 $\pm$ 3.75	
	11 to 15	16 5.70 $\pm$ 4.50	44 6.67 $\pm$ 3.75	
	16 to 20	20 7.96 $\pm$ 4.78	42 7.50 $\pm$ 4.30	
	> 20	40 5.01 $\pm$ 5.08	80 8.70 $\pm$ 5.37	
RET Lower maturity (%)	1 to 5	27 2.06 $\pm$ 2.48	41 1.46 $\pm$ 1.43	0.4192
	6 to 10	18 1.45 $\pm$ 1.45	42 1.79 $\pm$ 1.84	
	11 to 15	16 1.56 $\pm$ 1.20	44 1.13 $\pm$ 2.16	
	16 to 20	20 1.50 $\pm$ 2.05	42 1.91 $\pm$ 1.86	
	> 20	40 1.39 $\pm$ 1.74	80 2.06 $\pm$ 2.26	
RMI (%)	1 to 5	27 11.48 $\pm$ 8.39	41 10.78 $\pm$ 6.73	0.2471
	6 to 10	18 9.86 $\pm$ 4.84	42 10.86 $\pm$ 6.50	
	11 to 15	16 7.67 $\pm$ 6.59	44 8.74 $\pm$ 6.71	
	16 to 20	20 10.31 $\pm$ 8.56	42 9.28 $\pm$ 7.67	
	> 20	40 7.58 $\pm$ 8.26	80 12.25 $\pm$ 9.00	

RET: reticulocytes; RET #: Absolute value; RMI: RET Maturity Index

Table 3: sTfR (soluble Transferrin Receptor), s-Epo (erythropoietin) and FER (ferritin) levels

Parameter	Age Groups	THALASSEMICS n Median $\pm$ SD	CONTROLS n Median $\pm$ SD	p	p
sTfR (mg/L)	1 to 5	27 2.23 $\pm$ 0.70	41 1.80 $\pm$ 0.43	0.0001	0.0082
	6 to 10	18 1.79 $\pm$ 0.52	42 1.68 $\pm$ 0.40		0.3882
	11 to 15	16 1.68 $\pm$ 0.37	44 1.43 $\pm$ 0.43		0.0691
	16 to 20	20 1.57 $\pm$ 0.84	42 1.36 $\pm$ 0.38		0.0966
	> 20	40 1.51 $\pm$ 0.52	80 1.35 $\pm$ 0.39		0.0436
s-Epo (mU/mL)	1 to 5	27 10.30 $\pm$ 5.43	41 9.20 $\pm$ 5.20	0.5711	
	6 to 10	18 7.40 $\pm$ 5.91	31 9.40 $\pm$ 5.27		
	11 to 15	16 7.80 $\pm$ 6.70	28 7.45 $\pm$ 3.89		
	16 to 20	20 8.05 $\pm$ 6.61	42 7.50 $\pm$ 3.04		
	> 20	40 9.50 $\pm$ 6.28	80 9.20 $\pm$ 6.18		
FER (ng/mL)	1 to 5	27 35.30 $\pm$ 22.63	41 37.00 $\pm$ 21.10	0.8646	
	6 to 10	18 28.20 $\pm$ 26.29	42 29.85 $\pm$ 28.84		
	11 to 15	16 44.55 $\pm$ 18.35	44 48.55 $\pm$ 37.52		
	16 to 20	20 51.80 $\pm$ 44.47	42 33.95 $\pm$ 58.19		
	> 20	40 89.75 $\pm$ 80.01	80 102.00 $\pm$ 80.95		



4- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

Em regiões endêmicas de malária, a seleção positiva de genes relacionados às hemoglobinopatias, às alterações hereditárias da membrana das hemácias, como a esferocitose, a eliptocitose e a ovalocitose, e às deficiências enzimáticas, como a deficiência de G6PD e de piruvato-quinase, é bastante conhecida e evidenciada pela sobreposição dos mapas de distribuição de um e outro no globo terrestre (FLINT et al., 1986; ALLEN et al., 1997; PATTANAPANYASAT et al., 1999). Os mecanismos pelos quais o gene da Hb S têm sido positivamente selecionado foram melhor investigados por experimentos *in vivo* e *in vitro*. Nas talassemias, no entanto, as evidências ainda carecem de comprovação experimental, embora haja um enorme esforço de muitos grupos de pesquisadores, em diversos países, para elucidar os fatores aqui envolvidos (WEATHERALL et al., 2001).

O aumento dos níveis de sTfR em crianças α^+ -talassêmicas das ilhas do Sudoeste do Pacífico (Papua Nova Guiné e Vanuatu), região endêmica de malária por *P. vivax* e *P. falciparum* concomitantemente, e onde a frequência do alelo α^+ -talassêmico é tão elevada quanto 70%, somado à informação prévia de que crianças α^+ -talassêmicas, nos dois primeiros anos de vida, seriam mais susceptíveis à infecção pelo *P. vivax*, cuja preferência se dá por reticulócitos do sangue periférico, tornando-se mais resistentes à malária *falciparum* na vida adulta, levou um grupo inglês a sugerir a hipótese de que um certo grau de eritropoiese ineficaz poderia estar ocorrendo mesmo nessa forma discreta de talassemia e que poderia explicar o (ou um dos) mecanismo(s) que estariam levando à forte seleção positiva do alelo α^+ -talassêmico nessas regiões (REES et al, 1998). É importante ressaltar que, segundo os autores, crianças com malária ativa, investigada pela busca dos parasitas em sangue periférico recém-coletado, foram excluídas da casuística analisada. Esse grupo, no entanto, não avaliou o *status* dos reticulócitos nessa população, cuja necessidade é indicada na discussão da correspondente publicação. MOCKENHAUPT et al., um ano mais tarde, analisando uma população de crianças africanas, da Nigéria, região endêmica de malária por *P. falciparum*, com elevadas prevalências de talassemia α^+ , demonstraram que, na malária crônica, os níveis de sTfR estão aumentados, como indicativo de expansão da atividade eritropoiética para adequada resposta compensatória da hemólise crônica. A pesquisa de parasitas, nesse caso, incluiu a análise molecular por PCR

que, em parte dos casos em que a pesquisa no sangue fresco foi negativa, detectou a infecção. Não houve, nesse estudo, associação entre o genótipo α e os níveis de sTfR (MOCKENHAUPT et al, 1999b).

O objetivo do nosso trabalho foi avaliar a atividade eritropoiética na talassemia α^+ heterozigótica, em portadores da região Sudeste brasileira, área não endêmica de malária, com enfoque na contagem e determinação dos graus de maturidade dos reticulócitos circulantes. Nesta região do país, a talassemia α^+ tem atingido elevadas prevalências em função, principalmente, da contribuição da população de origem africana trazida na época da colonização portuguesa à população desta região do país, e, em menor grau, da imigração de outros povos, particularmente do Sudeste Asiático e da Região Mediterrânea, em períodos mais recentes (SONATI et al, 1990 e 1991; BORGES et al., 2001). Para o estudo, os indivíduos foram classificados por faixas etárias em 5 subgrupos: 1-5 anos, 6-10, 11-15, 16-20 e maior de 20, que foram comparados a seus respectivos controles normais. Os subgrupos controles tiveram uma proporção mínima de 1,5 vez o tamanho amostral de seu correspondente subgrupo talassêmico. Para complementação da avaliação da atividade eritropoiética, os níveis séricos de sTfR e EPO também foram analisados. Indivíduos com concentrações de ferritina sérica abaixo da faixa de normalidade foram excluídos do estudo para que não houvesse a interferência da deficiência de ferro nas dosagens de sTfR (VERNET e DOYEN, 2000).

De acordo com os resultados aqui obtidos, não houve diferença significativa na avaliação dos reticulócitos, seja em relação à contagem (percentagens e valores absolutos), seja em relação às frações de maturidade e ao índice de maturidade dos RET (RMI), entre os grupos talassêmicos e controles, em qualquer faixa etária. A contagem e a maturidade dos reticulócitos têm se mostrado muito úteis na avaliação da atividade eritropoiética, principalmente quando determinadas através de metodologias automatizadas, que aumentaram a precisão, a acurácia e a reprodutibilidade das análises (BRUGNARA, 2000; CHOI e PAI, 2001; WILLIAMS et al., 2001).

Quanto aos níveis de sTfR, as medianas dos valores obtidos foram mais elevadas, em todas as faixas etárias, nos portadores de talassemia α^+ , embora tenha havido diferença significativa somente nas faixas de 1-5 e superior a 20 anos. As dosagens de

EPO sérica estiveram dentro dos valores de referência e não diferiram entre os grupos talassêmicos e controles, em qualquer faixa etária.

Conclusões: esses resultados, juntos, são compatíveis com um discreto aumento da atividade eritropoiética na medula eritróide, provavelmente como resposta compensatória à microcitose e à hipocromia características das talassemias, tendo em vista que os eritroblastos em divisão, muito mais que os reticulócitos, são os responsáveis pelos níveis de sTfR (R'ZIK et al., 2001; BEGUIN, 2003). A maior diferença observada se deu no subgrupo de 1-5 anos, resultado também compatível com um aumento das necessidades de ferro próprias da primeira infância (LÓPEZ et al., 2001; SUOMINEN et al., 2001).

A hipótese de que crianças α^+ -talassêmicas teriam algum grau de eritropoiese ineficaz, com conseqüente aumento do número e de formas imaturas de reticulócitos em circulação no sangue periférico, que as tornariam, em áreas endêmicas de malária, mais susceptíveis à infecção pelo *P. vivax*, desenvolvendo assim resistência posterior à infecção pelo *P. falciparum*, não pode ser aqui comprovada. Ao contrário, nosso estudo mostrou que os níveis do sTfR estão mais elevados na talassemia α^+ , particularmente em algumas faixas etárias como na primeira infância, mesmo em indivíduos que não estão sujeitos à ação da malária. Esse parâmetro, analisado isoladamente, não pode permitir conclusão sobre a existência de alteração da eritropoiese.

A própria fisiopatologia da malária pode estar associada a um aumento nos níveis do sTfR, com anemia devido à hemólise causada por ruptura de RBC durante a liberação de merozoítos, fagocitose esplênica, fagocitose aumentada de hemácias infectadas e hemólise daquelas não infectadas, detectadas por alterações na superfície da membrana ou por ligação com anticorpos, ou ainda, devido à reduzida produção de eritrócitos resultante da diseritropoiese, que levará à eritropoiese ineficaz (VERHOEF et al., 2001; NAGEL, 2002). A malária crônica, onde a atividade eritropoiética estará aumentada para compensação de hemólise crônica, pode inclusive não ser detectada se técnicas moleculares não forem empregadas (MOCKENHAUPT et al., 1999b).

Outros mecanismos podem estar levando à expressiva seleção positiva do alelo α^+ -talassêmico e proteção contra a malária *falciparum* em áreas endêmicas, como o prejudicado crescimento e desenvolvimento intraeritrocítico dos parasitas nas hemácias α^+ -

talassêmicas (PATTANAPANYASAT et al. 1999), dado o seu menor teor de Hb, a própria microcitose (MOCKENHAUPT et al., 1999c) e a aumentada susceptibilidade desses eritrócitos ao stress oxidativo e à oxidação da Hb (DESTRO-BISOL et al., 1999). Além disso, fatores imunológicos como a modificação da expressão de antígenos de superfície de membrana das hemácias α -talassêmicas (LUZZI et al., 1991; WILLIAMS et al., 2002), a homologia entre proteínas de ligação do *P. falciparum* e do *P. vivax* (PvRBP) (TRIGLIA et al., 2001; CANTOR et al., 2001; RODRÍGUEZ et al., 2002; ESPINOSA et al., 2003; OCAMPO et al., 2003), e a formação prejudicada de rosetas em hemácias microcíticas infectadas, fenômeno observado *in vitro* e que parece ser devido à deficiência de Receptor 1 do Complemento (CR1), proteína que controla a ativação do Complemento e o clearance de imune-complexos, conferindo proteção contra malária grave pelo *P. falciparum* (CARLSON et al., 1994; COCKBUM et al., 2004), podem estar contribuindo mais efetivamente para o processo seletivo.

Somente estudos *in vivo* de cinética de ferro, com a utilização de Fe radioativo, e experimentos para avaliação da apoptose em culturas de células eritróides poderão permitir uma investigação mais aprofundada da eritropoiese além daquela desenvolvida aqui (MATHIAS et al., 2000; KEAN et al., 2002), embora análises de estudos ferrocinéticos em pacientes com Doença de Hb H tenham demonstrado que a anemia, nessa forma de talassemia α , que é a mais grave em indivíduos adultos, resulta majoritariamente da hemólise, havendo, contrariamente ao que ocorre nas talassemias β , um grau mínimo de eritropoiese ineficaz (POOTRAKUL et al., 2000).

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN J.; BACKSTROM K.R.; COOPER J.A.; COOPER M.C.; DETWILER T.C.; ESSEX D.W. et al. Measurement of soluble transferrin receptor in serum of healthy adults. **Clinical Chemistry**, 44(1):35-9, 1998.

ALLEN S.J.; O'DONNELL A.O.; ALEXANDER N.D.E.; ALPERS M.P.; PETO T.E.A.; CLEGG, J.B. et al. α^+ -thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 94:14736-41, 1997.

ARENDS, A.; ALVAREZ, M.; VELASQUEZ, D.; BRAVO, M.; SALAZAR, R.; GUEVARA, J.M. Determination of beta-globin gene cluster haplotypes and prevalence of alpha-thalassemia in sickle cell anemia patients in Venezuela. **American Journal of Hematology**, 64(2):87-90, 2000.

BAYNES, R.D. Assessment of Iron Status, **Clinical Biochemistry**, 29(3): 209-15, 1996.

BEERENHOUT, C.; BEKERS, O.; KOOMAN, J.P.; VAN DER SANDE, F.M.; LEUNISSEN, K.M.L. A Comparison between the Soluble Transferrin Receptor, Transferrin Saturation and Serum Ferritin as Markers of Iron State in Hemodialysis Patients. **Nephron**, 92: 32-5, 2002.

BEGUIN, Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. **Clinica Chimica Acta**, 329: 9 – 22, 2003.

BIANCO, I.; CAPPABIANCA, M.P.; FOGLIETTA, E.; LERONE, M.; DEIDDA, G.; MORLUPI, L. et al. Silent Thalassemias: genotypes and phenotypes. **Haematologica**, 82: 269-80, 1997.

BORGES, E.; WENNING M.R.S.C.; KIMURA, E.M.; GERVÁSIO, S.A.; COSTA, F.F.; SONATI, M.F. High prevalence of α -thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 34(6):759-62, 2001.

BRITTENHAM, G.M; WEISS, G.; BRISSOT, P.; LAINÉ, F.; GUILLYGOMARC'H, A; GUYADER, D. et al. Clinical Consequences of New Insights in the Pathophysiology of Disorders of Iron and Heme Metabolism. **Hematology (American Society of Hematology Education Program)**, 39-50, 2000.

BRUGNARA, C. Reticulocyte cellular indices: a new approach in the diagnosis of anemias and monitoring of erythropoietic function. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, 37(2): 93-130, 2000.

BUNN, H.F.; FORGET, B.G. **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1986.

CAIRO, G.; RECALCATI, S.; PIETRANGELO, A.; MINOTTI, G. The Iron Regulatory Proteins: targets and modulators of free radical reactions and oxidative damage. **Free Radical Biology & Medicine**, 32 (12): 1237-43, 2002.

CANTOR, E.M.; LOMBO, T.B.; CEPEDA, A.; ESPINOSA, A.M.; BARRERO, C.A; GUZMÁN, F. et al. *Plasmodium vivax*: functional analysis of a highly conserved PvRBP-1 protein region. **Molecular & Biochemical Parasitology**, 117: 229-34, 2001.

CARLSON, J.; NASH, G.B.; GABUTTI, V.; AL-YAMAN, F.; WAHLGREN, M. Natural protection against severe *Plasmodium falciparum* malaria due to impaired rosette formation. **Blood**, 84: 3909-14, 1994.

CASAS-CASTANEDA, M.; HERNANDEZ-LUGO, I.; TOMAS, O.; BARAJAS, H.; CIBRIAN, S.; ZANUNDIO, G. Alpha-thalassemia in a selected population of México. **Revista de Investigacion Clinica**, 50(5):395-8, 1998.

CAZZOLA, M.; BEGUIN, Y.; BERGAMASCHI, G.; GUARNONE, R.; CERANI, P.; BARELLA, S. et al. Soluble transferrin receptor as a potential determinant of iron loading in congenital anaemias due to ineffective erythropoiesis. **British Journal of Haematology**, 106: 752-5, 1999.

CHOI, J.W.; PAI, S.H. Reticulocyte subpopulations and Reticulocyte Maturity Index (RMI) rise as body iron status falls. **American Journal of Hematology**, 67:130-5, 2001.

CHOTIVANICH, K.; UDOMSANGPETCH, R.; PATTANAPANYASAT, K.; CHIERAKUL, W.; SIMPSON, J.; LOOAREESUWAN, S. et al. Hemoglobin E: a balanced polymorphism protective against high parasitemias and thus severe *P falciparum* malaria. **Blood**, 100 (4): 1172-6, 2002.

CHUI, D.H.K.; WAYE, J.S. Hydrops Fetalis caused by α -Thalassemia: An emerging health care problem. **Blood**, 91 (7): 2213-22, 1998.

CLARK, G.M.; HIGGINS, T.N. Laboratory Investigation of Hemoglobinopathies and Thalassemias: Review and Update. **Clinical Chemistry**, 46:8(B) 1284-90, 2000.

COCKBURN, I.A.; MACKINNON, M.J.; O'DONNELL, A.; ALLEN, S.J.; MOULDS, J.M.; BAISOR, M. et al. A human complement receptor 1 polymorphism that reduces *Plasmodium falciparum* rosetting confers protection against severe malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 101(1):272-7, 2004.

COOK, J.D.; SKIKNE, B.S.; BAYNES, R.D. Serum transferrin receptor, **Annual Review of Medicine**. 44:63-74, 1993.

CORBERAND, J.X. Reticulocyte analysis using flow cytometry. **Hematology and Cell Therapy**, 38: 487-94, 1996.

COSTA F.F.; SONATI, M.F.; ZAGO, M.A. Deletion Type Alpha-Thalassemia Among Brazilian Patients With Sickle Cell Anemia. **Revista Brasileira de Genética**, 12 (3): 605-11, 1989.

COTTON, F.; THIRY, P.; BOEYNAEMS, J.M. Measurement of soluble transferrin receptor by immunoturbidimetry and immunonephelometry. **Clinical Biochemistry**, 33(4):263-7, 2000.

DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. **Practical Hematology**. 8th. ed. Churchill, Livingstone, 1995.

DESTRO-BISOL, G.; D'ALOJA, E.; SPEDINI, G.; SCATENA, R.; GIARDINA, B.; PASCALI, V. Brief communication: resistance to *falciparum* malaria in α -thalassemia, oxidative stress and hemoglobin oxidation. **American Journal of Physical Anthropology**, 109:269-73, 1999.

DI RIENZO, A.; NOVELLETTO, A.; ALIQUO M.C.; BIANCO, I.; TAGARELLI, A.; BRANCATI, C. et al. Molecular basis for Hb H disease in Italy: geographical distribution of deletional and nondeletional alpha-thalassemia haplotypes. **American Journal of Human Genetics**, 39:631-9, 1986.

DODÉ, C.; KRISHNAMOORTHY, R.; LAMB, J.; ROCHETTE, J. Rapid analysis of $-\alpha^{3.7}$ thalassaemia and $\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$ triplication by enzymatic amplification analysis. **British Journal of Haematology**, 82:105-11, 1992.

ESPINOSA, A.M.; SIERRA, A.Y.; BARRERO, C.A.; CEPEDA, L.A.; CANTOR, E.M.; LOMBO, C.A. et al. Expression, polymorphism analysis, reticulocyte binding and serological reactivity of two *Plasmodium vivax* MSP-1 protein recombinant fragments. **Vaccine**, 21: 1033-43, 2003.

FLINT, J.; HILL, A.V.S.; BOWDEN, D.K.; OPPENHEIMER, S.J.; SILL, P.R.; SERJEANTSON, S.W. et al. High frequencies of α -thalassaemia are the result of natural selection by malaria. **Nature**, 321: 744-50, 1986.

FOGLIETTA, E.; DEIDDA, G.; GRAZIANI, B.; MODIANO, G.; BIANCO, I. Detection of α -Globin gene disorders by a simple PCR methodology. **Haematologica**, 81:387-96, 1996.

FUCHAROEN, S.; WINICHAGOON, P.; THONGLAIRUAN, V. Beta-thalassemia associated with alpha-thalassemia in Thailand. **Hemoglobin**, 12:581-92, 1988.

GALANELLO, R.; SOLLAINO, C.; PAGLIETTI, E.; BARELLA, S.; PERRA, C.; DONEDDU, I. et al. α -Thalassemia Carrier Identification by DNA Analysis in the Screening for Thalassemia. **American Journal of Hematology**, 59: 273-8, 1998.

GALINSKI, M.; MEDINA, C.; INGRAVALLO, P.; BARNWELL, J. A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. **Cell**, 69: 1213-26, 1992.

GONZALEZ, F.A.; SÁNCHEZ, J.; Llorente, L.; VILLEGAS, A. Changes in reticulocytes fractions during peripheral stem cell harvesting exclusively mobilized with rhG-CSF. **Bone Marrow Transplantation**, 18: 673-4, 1996.

GONZALEZ, F.A.; BERMEJO, A.; SANCHEZ, J.; VILLEGAS, A. Valor del análisis de las subpoblaciones reticulocitarias en el estudio de las poliglobulias. **Sangre**, 42 (5): 383-6, 1997.

GREENBERG, P.L.; GORDEUK, V.; ISSARAGRISIL, S.; SIRITANARATKUL, N.; FUCHAROEN, S.; RIBEIRO, R.C. Major hematologic diseases in the Developing World – New aspects of diagnosis and management of thalassemia, malarial anemia, and leukemia. **Hematology (American Society of Hematology Education Program)**, 479-98, 2001.

HAILE, D.J. Regulation of genes of iron metabolism by the iron-response proteins. **American Journal of Medical Sciences**, 318: 230-40, 1999.

HARTEVELD, C.L.; LOSEKOOT, M.; HEISTER, J.G.A.M.; WIELEN, M.; GIORDANO, P.C.; BERNINI, L.F. α -Thalassaemia in The Netherlands: a heterogeneous of both deletions and point mutations. **Human Genetics**, 100: 465-71, 1997.

HENNI, T.; MORLÉ, F.; LOPEZ, B.; COLONNA, P.; GODET, J. Alpha-thalassemia haplotypes in the Algerian population. **Human Genetics**, 75:272-6, 1987.

HENTZE, M.W.; KUHN, L.C. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 93: 8175-82, 1996.

HENRY, J.B. **Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 20th. Edition, USA. Ed. W.B. Saunders Company, 2001.

HIGGS, D.R.; PRESSLEY, L.; SERJEANT, G.R.; CLEGG, J.B.; WEATHERALL, D.J. The genetics and molecular basis of alpha-thalassemia in association with Hb S in Jamaican Negroes. **British Journal of Haematology**, 47:43-56, 1981.

HIGGS, D.R.; HILL, A.V.S.; BOWDEN, D.K.; WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. Independent recombination events between the duplicated human α globin genes; implications for their concerted evolution. **Nucleic Acids Research**, 12: 6965-77, 1984.

HIGGS, D.R.; VICKERS, M.A.; WILKIE, A.O.M.; PRETORIUS, I.M.; JARMAN, A.P.; WEATHERALL, D.J. A review of the molecular genetics of the human α globin gene cluster. **Blood**, 73:1081-104, 1989.

HILL, A.V.S.; BOWDEN, D.K.; TRENT, R.J.; HIGGS, D.R.; OPPENHEIMER, S.J.; THEIN, S.L. et al. Melanesians and Polynesians share a unique alpha-thalassemia mutation. **American Journal of Human Genetics**, 37:571-80, 1985.

HOFFBRAND, A.V.; PETTIT, J.E. **Essencial Haematology**, 3rd. edition, London, Edinburgh, Boston, Blackwell Scientific Publication, 1995.

HUEBERS, H.A.; FINCH, C.A. The physiology of transferrin and transferrin receptors. **Physiological Reviews**, 67:520-72, 1987.

HUEBERS, H.A.; BEGUIN, Y.; POOTRAKUL, P.; EINSPAHR, D.; FINCH, C.A. Intact Transferrin Receptors in Human Plasma and their relation to Erythropoiesis. **Blood**, 75 (1): 102-7, 1990.

JOHNSON, C.S.; CONSTANTINE, T.; BEUTLER, E. Alpha-thalassemia. Prevalence and hematologic findings in American Blacks. **Archives of Internal Medicine**, 142:1280-3, 1982.

JOOSTEN, E.; VAN LOON, R.; BILLEN, J.; BLANCKAERT, N.; FABRI, R.; PELEMANS, W. Serum Transferrin Receptor in the evaluation of the Iron Status in Elderly Hospitalized Patients with Anemia. **American Journal of Hematology**, 69: 1-6, 2002.

KANAVAKIS, E.; TZOTZOS, S.; LIAPAKI, A.; METAXOTOU-MAVROMATI, A.; KATTAMIS, A. Frequency of alpha-thalassemia in Greece. **American Journal of Hematology**, 22:225-32, 1986.

KATTAMIS, A.C.; CASMASCHELLA, C.; SIVERA, P.; SURREY, S.; FORTINA, P. Human α -thalassemia Syndromes: detection of molecular defects. **American Journal of Hematology**, 53:81-91, 1996.

KEAN, L.S.; BROWN, L.E.; NICHOLS, J.W.; MOHANDAS, N.; ARCHER, D.R.; HSU, L.L. Comparison of mechanisms of anemia in mice with sickle cell disease and β -thalassemia: Peripheral destruction, ineffective erythropoiesis, and phospholipid scramblase-mediated phosphatidylserine exposure. **Experimental Hematology**, 30:394-402, 2002.

KHUHAPINANT, A.; BUNYARATVEJ, A.; TATSUMI, N.; PRIBWAI, M.; FUCHAROEN, S. Number and maturation of reticulocytes in various genotypes of thalassaemia as assessed by flow cytometry. **Acta Haematologica**, 91:119-25, 1994.

KHUMALO, H.; GOMO, Z.A.R.; MOYO, V.M.; GORDEUK, V.R.; SAUNGWEME, T.; ROUAULT, T.A. et al. Serum transferrin receptors are decreased in the presence of iron overload. **Clinical Chemistry**, 44 (1): 40-4, 1998.

KOHGO, Y.; NISHISATO, T.; KONDO, H.; TSUSHIMA, N.; NIITSU, Y.; URUSHIZAKI, I. Circulating transferrin receptor in human serum. **British Journal of Haematology**, 64: 277-81, 1986.

KUIPER-KRAMER, E.P.A.; COENEN, J.L.L.M.; HUISMAN, C.M.S.; ABBES, A.; RAAN, J.; EIJK, H.G. Relationship between soluble transferrin receptors in serum and membrane-bound transferrin receptors. **Acta Haematologica**, 99:8-11, 1998.

LAUER, J.; SHEN, C.J.; MANIATIS, T. The Chromosomal Arrangement of Human α -Like Globin Genes: Sequence Homology and α -Globin Gene Deletions. **Cell**, 20: 119-30, 1980.

LEE, E.J.; OH, E.J.; PARK, Y.J.; LEE, H.K.; KIM, B.K. Soluble transferrin receptor (sTfR), Ferritin, and sTfR/Log Ferritin Index in anemic patients with nonhematologic malignancy and chronic inflammation. **Clinical Chemistry**, 48 (7):1118-21, 2002.

LIEBHABER, S.A.; CASH, F.E.; BALLAS, S.K. Human α globin gene expression. The Dominant Role of the $\alpha 2$ -Locus in mRNA and Protein Synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, 261: 15327-33, 1986.

LOBMAYR, L.; SAUER, T.; KILLISCH, I.; SCHRANZHOFER, M.; WILSON, R.B.; PONKA, P. et al. Transferrin receptor hyperexpression in primary erythroblasts is lost on transformation by avian erythroblastosis virus. **Blood**, 100: 289-98, 2002.

LOK, C.N.; PONKA, P. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. **Journal of Biological Chemistry**, 274: 24147-52, 1999.

LÓPEZ, M.A.V.; MORALES, A.C.; VICO, J.M.; LLORENS, R.M.; BONACHERA, M.D.C.; MUNÓZ, J.L. et al. Receptor sérico de la transferrina en niños sanos. **Anales Españoles de Pediatría**, 55(2): 113-20, 2001.

LUZZI, G.A.; MERRY, A.H.; NEWBOLD, C.I.; MARSH, K.; PASVOL, G. Protection by α -thalassaemia against *Plasmodium falciparum* malaria: modified surface antigen expression rather than impaired growth or cytoadherence. **Immunology Letters**, 30:233-40, 1991.

MALOPE, B.I.; MACPHAIL, A.P.; ALBERTS, M.; HISS, D.C. The ratio of serum transferrin receptor and serum ferritin in the diagnosis of iron status. **British Journal of Haematology**, 115: 84-9, 2001.

MAST, A.E.; BLINDER, M.A.; GRONOWSKI, A.M.; CHUMLEY, C.; SCOTT, M.G. Clinical utility of the soluble transferrin receptor and comparison with serum ferritin in several populations. **Clinical Chemistry**, 44(1): 45-51, 1998.

MATHIAS, L.A.; FISHER, T.C.; ZENG, L.; MEISELMAN, H.J.; WEINBERG, K.I.; HITI, A.L.; MALIK, P. Ineffective erythropoiesis in β -thalassemia major is due to apoptosis at the polychromatophilic normoblast stage. **Experimental Hematology**, 28: 1343-53, 2000.

MICHELSON, A.; ORKIN, S.H. Boundaries of Gene Conversion within the Duplicated Human α -Globin Genes. Concerted Evolution by Segmental Recombination. **Journal of Biological Chemistry**, 258 (24): 15245-54, 1983.

MOCKENHAUPT, F.P.; FALUSI, A.G.; MAY, J.; ADEMOWO, O.G.; OLUMESE, P.E.; MEYER, C.G. et al. The contribution of α^+ -thalassemia to anaemia in a Nigerian population exposed to intense malaria transmission. **Tropical Medicine and International Health**, 4: 302-7, 1999a.

MOCKENHAUPT, F.P.; MAY, J.; STARK, K.; FALUSI, A.G.; MEYER C.G.; BIENZLE, U. Serum transferrin receptor levels are increased in asymptomatic and mild *Plasmodium falciparum* infection. **Haematologica**, 84: 869-73, 1999b.

MOCKENHAUPT, F.P.; BIENZLE, U.; MAY, J.; STARK, K.; FALUSI, A.G.; ADEMOWO, O.G. et al. *Plasmodium falciparum* infection: influence on Hemoglobin levels in α -thalassemia and microcytosis. **The Journal of Infectious Diseases**, 180: 925-8, 1999c.

NAGEL, R.L. Malarial anemia. **Hemoglobin**, 26 (4): 329-43, 2002.

NEISHABURY, M.; OBERKANINS, C.; MOHEB, L.A.; POURFATHOLUAH, A.A.; KAHIRIZI, K.; KEYHANY, E. et al. High prevalence of the $-\alpha^{3.7}$ deletion among thalassemia patients in Iran. **Hemoglobin**, 27(1):53-5, 2003.

NOGUERA, N.I.; BRAGOS, I.M.; MILANI, A.C. Prevalence of $\alpha^{3.7}$ -thalassemia in Argentina. **Hemoglobin**, 26(1):103-6, 2002.

NORONHA, J.F.A.; SOUZA, C.A.; VIGORITO, A.C.; ARANHA, F.J.P.; ZULLI, R.; MIRANDA, E.C.M. et al. Immature reticulocytes as an early predictor of engraftment in autologous and allogeneic bone marrow transplantation. **Clinical and Laboratory Haematology**, 25: 47-54, 2003.

OCAMPO, M.; VERA, R.; RODRIGUEZ, L.E.; CURTIDOR, H.; URQUIZA, M.; SUAREZ, J. et al. Plasmodium vivax Duffy binding protein peptides specifically bind to reticulocytes. **Peptides**, 23: 13-22, 2002.

ORON-KAMI, V.; FILON, D.; SHIFRIN, Y.; FRIED, E.; POGREBIJSKY, G.; OPPENHEIM, A. et al. Diversity of α -Globin Mutations and Clinical Presentation of α -Thalassemia in Israel. **American Journal of Hematology**, 65: 196-203, 2000.

OZSOYLU, S.; MALIK, S.A. Incidence of alpha-thalassemia in Turkey. **Turk Journal of Pediatrics**, 24(4):235-44, 1982.

PALIS, J.; SEGEL, G.B. Developmental biology of erythropoiesis. **Blood Reviews**, 12: 106-14, 1998.

PATTANAPANYASAT, K.; YONGVANITCHIT, K.; TONGTAW, P.; TACHAVANICH, K.; WANACHIWANAWIN, W.; FUCHAROEN, S. et al. Impairment of *Plasmodium falciparum* Growth in Thalassemic Red Blood Cells: further evidence by using biotin labeling and flow cytometry. **Blood**, 93 (9): 3116-9, 1999.

PONKA, P.; BEAUMONT, C.; RICHARDSON, D.R. Function and Regulation of Transferrin and Ferritin. **Seminars in Hematology**, 35 (1): 35-54, 1998.

POOTRAKUL, P.; SIRANKAPRACHA, P.; HEMSORACH, S.; MOUNGSUB, W.; KUMBUNLUE, R.; PIANGITJAGUM, A. et al. A correlation of erythrokinetics, ineffective erythropoiesis, and erythroid precursor apoptosis in Thai patients with thalassemia. **Blood**, 96 (7): 2606-12, 2000.

PROUDFOOT, N.J.; MANIATIS, T. The Structure of a Human α -Globin Pseudogene and Its Relationship to α -Globin Gene Duplication. **Cell**, 21: 537-44, 1980.

PUNNONEN, K.; IRJALA, K.; RAJAMÄKI, A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. **Blood**, 89: 1052-7, 1997.

REES, D.C.; WILLIAMS, T.N.; MAITLAND, K.; CLEGG, J.B.; WEATHERALL, D.J. Alpha thalassaemia is associated with increased soluble transferrin receptor levels. **British Journal of Haematology**, 103:365-9, 1998.

RODRÍGUEZ, L.E.; URQUIZA, M.; OCAMPO, M.; CURTIDOR, H.; SUÁREZ, J.; GARCÍA, J. et al. *Plasmodium vivax* MSP-1 peptides have high specific binding activity to human reticulocytes. **Vaccine**, 20: 1331-9, 2002.

ROUSSEAU, J.; MATHEW, C.G.; REES, J.S.; DU TOIT, E.; BOTHA, M.C.; HARLEY, E.H. Incidence of Hb Barts and alpha-thalassaemia genotypes in a South African population. **Acta Haematologica**, 73(3):159-62, 1985.

R'ZIK, S.; LOO, M.; BEGUIN, Y. Reticulocyte transferrin receptor (TfR) expression and contribution to soluble TfR levels. **Haematologica**, 86:244-51, 2001.

SETIANINGSIH, I.; HARAHAP, A.; NAINGGOLAN, I.M. Alpha thalassaemia in Indonesia: phenotypes and molecular defects. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 531:47-56, 2003.

SHARPE, K.; HOPKINS, W.; EMSLIE, K.R.; HOWE, C.; TROUT, G.J.; KAZLAUSKAS, R. et al. Development of reference ranges in elite athletes for markers of altered erythropoiesis. **Haematologica**, 87 (12):1248-57, 2002.

SILVA, N.M.; SOLEDADE, C.S.; COSTA, F.F.; SONATI, M.F. Low MCV Values in Heterozygotes for Hemoglobin C are not secondary to α thalassemia. **Hemoglobin**, 26 (3): 305-9, 2002.

SKIKNE, B.S.; FLOWERS, C.H.; COOK, J.D. Serum Transferrin Receptor: A Quantitative Measure of Tissue Iron Deficiency. **Blood**, 75 (9):1870-6, 1990.

SONATI, M.F.; COSTA, F.F. Hemoglobin Bart's in a Brazilian Black Population. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 23: 395-6, 1990.

SONATI, M.F.; FARAH, S.B.; RAMALHO, A.S.; COSTA, F.F. High prevalence of α thalassemia in a black population of Brazil. **Hemoglobin**, 15:309-11, 1991.

SONATI, M.F.; KIMURA, E.M.; GROTO, H.Z.W.; TAVELLA, M.H.; COSTA, F.F. Hb H Disease Associated With the (α -^{MED}) Deletion in a Brazilian Black Woman. **Acta Hematologica**, 87: 145-7, 1992.

SONATI, M.F.; KIMURA, E.M.; GROTO, H.Z.W.; GERVÁSIO, S.A.; COSTA, F.F. Hereditary Hemoglobinopathies in a Population from Southeast Brazilian. **Hemoglobin**, 20: 175-9, 1996.

STAMATOYANNOPOULOS, G.; MAJERUS, P.W.; PERLMUTTER, R.M.; VARMUS, H. **The molecular bases of blood diseases**, 3rd. ed. Sounder Company, Philadelphia, 2001.

SUOMINEN, P.; VIRTANEN, A.; LEHTONEU-VEROMAA, M.; HEINONEN, O.J.; SALMI, T.T.; ALANEN, M. et al. Regression-based Reference limits for Serum Transferrin Receptor in Children 6 months to 16 years of age. **Clinical Chemistry**, 47 (5): 935-6, 2001.

TACCHINI, L.; BIANCHI, L.; BERNELLI-ZAZZERA, A.; CAIRO, G. Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. **Journal of Biological Chemistry**, 274: 24142-6, 1999.

THOMAS, C.; THOMAS, L. Biochemical Markers and Hematologic Indices in the Diagnosis of Functional Iron Deficiency. **Clinical Chemistry**, 48 (7): 1066-76, 2002.

TRAEGER-SYNODINOS, J.; KANAVAKIS, E.; TZETIS, M.; KATTAMIS, A.; KATTAMIS, C. Characterization of nondeletion alpha-thalassemia mutations in the Greek population. **American Journal of Hematology**, 44(3):162-7, 1993.

TRIGLIA, T.; THOMPSON, J.; CARUANA, S.R.; DELORENZI, M.; SPEED, T.; COWMAN, A.F. Identification of proteins from *Plasmodium falciparum* that are homologous to reticulocyte binding proteins in *Plasmodium vivax*. **Infection and Immunity**, 69:1084 -92, 2001.

VAN DAM, E.M.; STOORVOGEL, W. Dynamin-dependent Transferrin Receptor Recycling by Endosome-derived Clathrin-coated Vesicles. **Molecular Biology of the Cell**, 13: 169-82, 2002.

VAN DER DIJS, F.P.; VOLMER, M.; VAN GIJSSEL-WIERSMA, D.G.; SMIT, J.W.; VAN VEEN, R.; MUSKIET, F.A. Predictive value of cord blood hematological indices and Hb Barts for the detection of heterozygous alpha-thalassemia-2 in an African-Caribbean population. **Clinical Chemistry**, 45(9):1495-500, 1999.

VERHOEF, H.; WEST, C.E.; NDETO, P.; BUREMA, J.; BEGUIN, Y.; KOK, F.J. Serum transferrin receptor concentration indicates increased erythropoiesis in Kenyan children with asymptomatic malaria. **American Journal of Clinical Nutrition**, 74: 767-75, 2001.

VERNET, M.; DOYEN, C. Assessment of iron status with a new fully automated assay for transferrin receptor in Human Serum. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, 38(5): 437-42, 2000.

WATERS, H.M.; SEAL, L.H. A systematic approach to the assessment of erythropoiesis. **Clinical and Laboratory Haematology**, 23: 271-83, 2001.

WAYE, J.S.; ENG, B.; PATTERSON, M.; WALKER, L.; CARCAO, M.D.; OLIVIERI, N.F. et al. Hemoglobin H (Hb H) Disease in Canada: Molecular Diagnosis and Review of 116 cases. **American Journal of Hematology**, 68: 11-5, 2001.

WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B.; GIBBONS, R.; HIGGS, D.R.; OLD, J.M.; OLIVIERI, N.F. et al. **The Thalassemia Syndromes**, 4th edn, Blackwell Science, Oxford, 2001.

WEISS, G.; HOUSTON, T.; KASTNER, S.; JOHRER, K.; GRUNEWALD, K.; BROCK, J.H. Regulation of cellular iron metabolism by erythropoietin: activation of iron-regulatory protein and upregulation of transferrin receptor expression in erythroid cells. **Blood**, 89: 680-7, 1997.

WENNING, M.R.S.C.; KIMURA, E.M.; COSTA, F.F.; SAAD, S.T.O.; GERVÁSIO, S.; JORGE, S.B. et al. α -Globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 33: 1041-5, 2000.

WENNING, M.R.S.C.; HARTEVELD, C.L.; GIORDANO, P.C.; KIMURA, E.M.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. et al. Hemoglobin H disease resulting from the association of the $-\alpha^{3,7}$ rightward deletion and the $(\alpha\alpha)^{MM}$ deletion in a Brazilian patient. **European Journal of Haematology**, 69: 1-3, 2002.

WIANS JÚNIOR, F.H.; URBAN, J.E.; KROFT, S.H.; KEFFER, J.H. Soluble transferrin receptor (sTfR) concentration quantified using two sTfR kits: analytical and clinical performance characteristics. **Clinica Chimica Acta**, 303:75-81, 2001a.

WIANS JÚNIOR, F.H.; URBAN, J.E.; KEFFER, J.H.; KROFT, S.H. Discriminating between Iron Deficiency Anemia and Anemia of Chronic Disease using traditional Indices of Iron Status vs Transferrin Receptor Concentration. **American Journal of Clinical Pathology**, 115: 112-8, 2001b.

WILLIAMS, T.N.; MAITLAND, K.; BENNETT, S.; GANCZAKOWSKI, M.; PETO, T.E.; NEWBOLD, C.I. et al. High incidence of malaria in alpha-thalassemia children. **Nature** 10; 383: 522-5, 1996.

WILLIAMS, T.N.; WEATHERALL, D.J.; NEWBOLD, C.I. The membrane characteristics of *Plasmodium falciparum*-infected and -uninfected heterozygous α^0 thalassaemic erythrocytes. **British Journal of Haematology**, 118: 663-70, 2002.

WILLIAMS, W.J.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A.J.; LICHTMAN, M.A. **Hematology**, 6th. ed. McGraw-Hill Book Company, New York, 2001.

WINICHAGOON, P.; THONGLAIRUM, V.; FUCHAROEN, S.; THANPHAICHITO, V.S.; WASI, P. Alpha-thalassemia in Thailand. **Hemoglobin**, 12(5 e 6):485-98, 1988.

WORWOOD, M. Serum transferrin receptor assays and their application. **Annals of Clinical Biochemistry**, 39: 221-30, 2002.

WU, G.Y.; WANG, S.W.; ZHANG, J.W.; WANG, L.M. The incidence of alpha-thalassemia in South China. **Hemoglobin**, 12(5 e 6):529-32, 1988.

ZAGO, M.A.; COSTA, F.F.; TONE, L.G.; BOTTURA, C. Hereditary Hemoglobin Disorders in a Brazilian Population. **Human Heredity**, 33: 125-9, 1983.

ZAGO, M.A.; COSTA, F.F. Hereditary Haemoglobin Disorders in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 79: 385-8, 1985.

ZENG, Y.T.; HUANG, S.Z.; CHEN, M.J. et al. The types and distribution of alpha-thalassemia-2 in China. **Hemoglobin**, 12(5 e 6): 455-8, 1988.

ZORAI, A.; HARTEVELD, C.L.; BAKIR, A.; VAN DELFT, P.; FALFOUL, A.; DELLAGI, K. et al. Molecular spectrum of alpha-thalassemia in Tunisia: epidemiology and detection at birth. **Hemoglobin**, 26(4):353-62, 2002.



6- ANEXOS

Níveis dos Receptores solúveis de Transferrina e Graus de Maturidade dos Reticulócitos na Talassemia α^+

Objetivos

- 1- Análise descritiva dos parâmetros para cada grupo e em cada faixa etária.
- 2- Comparar os grupos Talassêmicos e controles e as faixas de idade para todos os parâmetros.

Metodologia Estatística

Utilizamos estatísticas descritivas para os parâmetros, por grupo e faixa etária.

Para explicar a variabilidade dos parâmetros, em função dos fatores grupo e faixa etária utilizamos a Análise de Variância (ANOVA) com transformação Rank, devido a não existência de normalidade dos dados, para diminuir a assimetria e variabilidade dos dados.

Através da significância de cada fator com relação aos parâmetros, poderemos dizer se existe diferença entre os grupos ou entre as faixas. Quando o fator é significativo realiza-se testes de comparação múltipla (Teste de Tukey) para identificar as diferenças.

Tabela 1. Resultados da Análise de Variância (RET % - Reticulócitos)

Fonte de Variação	g.l.	Soma de Quadrados Tipo III	Quadrado Médio	F	p-valor
Grupo	1	13880.77	13880.77	1.25	0.2643
Faixa Etária	4	201948.54	50487.13	4.55	0.0014
Grupo*Faixa	4	8020.37	2005.09	0.18	0.9484

Grupo	Faixa	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
C	1-5	41	1.44	0.46	0.55	1.34	2.74
	6-10	42	1.36	0.43	0.58	1.35	2.36
	11-15	44	1.29	0.41	0.54	1.26	2.14
	16-20	42	1.29	0.40	0.56	1.25	2.17
	> 20	80	1.16	0.51	0.18	1.20	2.54
T	1-5	27	1.42	0.46	0.56	1.39	2.60
	6-10	18	1.30	0.30	0.84	1.26	1.80
	11-15	16	1.24	0.59	0.72	1.10	2.74
	16-20	20	1.31	0.61	0.22	1.08	2.59
	> 20	40	1.12	0.60	0.20	0.96	2.60

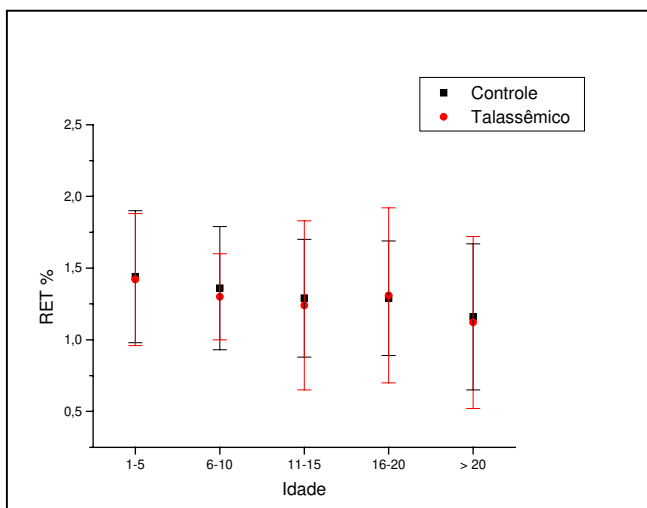


Fig 1. RET % médio dos grupos, por faixa etária
Teste de Tukey - $\alpha = 0.05$

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.				
FAIXA Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits		
1-5 - 6-10	17.13	-34.04	68.30	
1-5 - 16-20	33.30	-17.43	84.03	
1-5 - 11-15	41.23	-9.94	92.40	
1-5 - > 20	63.12	19.27	106.97	***
6-10 - 16-20	16.17	-36.15	68.48	
6-10 - 11-15	24.10	-28.64	76.84	
6-10 - > 20	45.99	0.31	91.67	***
16-20 - 11-15	7.93	-44.38	60.25	
16-20 - > 20	29.82	-15.36	75.01	
11-15 - > 20	21.89	-23.79	67.57	

Tabela 2. Resultados da Análise de Variância (RET # - Valores absolutos)

Fonte de Variação	g.l.	Soma de Quadrados Tipo III	Quadrado Médio	F	p-valor
Grupo	1	4230.78	4230.78	0.37	0.5421
Faixa	4	122526.40	30631.60	2.70	0.0308
Grupo*Faixa	4	5389.47	1347.37	0.12	0.9759

Grupo	Faixa	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
C	1-5	41	0.0673	0.0227	0.0282	0.0644	0.1388
	6-10	42	0.0640	0.0213	0.0259	0.0629	0.1111
	11-15	44	0.0597	0.0185	0.0247	0.0589	0.1030
	16-20	42	0.0618	0.0191	0.0262	0.0594	0.1027
	> 20	80	0.0566	0.0246	0.0091	0.0592	0.1223
T	1-5	27	0.0671	0.0194	0.0286	0.0628	0.1095
	6-10	18	0.0677	0.0181	0.0389	0.0641	0.1103
	11-15	16	0.0638	0.0275	0.0389	0.0593	0.1347
	16-20	20	0.0672	0.0300	0.0119	0.0583	0.1233
	> 20	40	0.0589	0.0301	0.0108	0.0548	0.1286

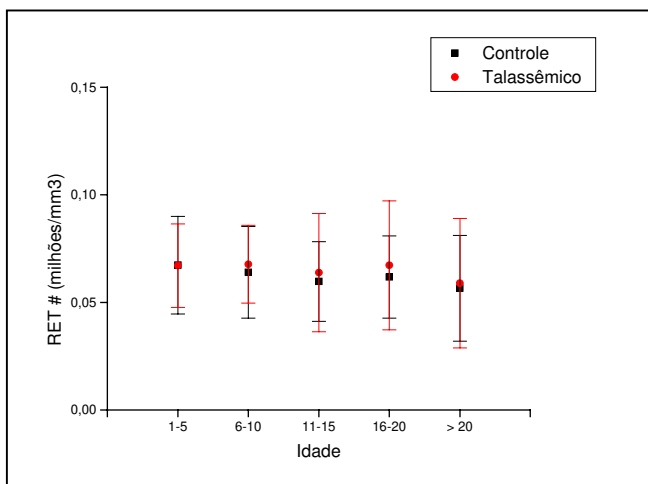


Fig 2. RET # médio dos grupos, por faixa etária

Teste de Tukey - $\alpha = 0.05$

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.				
FAIXA Comparison		Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits	
1-5	- 6-10	8.10	-43.67	59.87
1-5	- 16-20	21.07	-30.25	72.40
1-5	- 11-15	34.89	-16.88	86.66
1-5	- > 20	46.49	2.13	90.86
6-10	- 16-20	12.98	-39.95	65.90
6-10	- 11-15	26.79	-26.57	80.15
6-10	- > 20	38.40	-7.82	84.61
16-20	- 11-15	13.82	-39.11	66.75
16-20	- > 20	25.42	-20.29	71.13
11-15	- > 20	11.60	-34.61	57.82

Tabela 3. Resultados da Análise de Variância (CRC% -RET corrigido pelo hematócrito)

Fonte de Variação	g.l.	Soma de Quadrados Tipo III	Quadrado Médio	F	p-valor
Grupo	1	39363.14	39363.14	3.43	0.0650
Faixa	4	38422.15	9605.53	0.84	0.5029
Grupo*Faixa	4	2879.68	719.92	0.06	0.9927

Grupo	Faixa	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
C	1-5	41	1.27	0.43	0.54	1.19	2.65
	6-10	42	1.27	0.44	0.50	1.27	2.27
	11-15	44	1.23	0.40	0.49	1.21	2.22
	16-20	42	1.28	0.41	0.56	1.23	2.22
	> 20	80	1.19	0.51	0.19	1.24	2.43
T	1-5	27	1.15	0.38	0.44	1.05	1.92
	6-10	18	1.19	0.34	0.68	1.16	2.01
	11-15	16	1.17	0.53	0.66	1.03	2.53
	16-20	20	1.27	0.59	0.21	1.08	2.46
	> 20	40	1.10	0.56	0.19	0.99	2.43

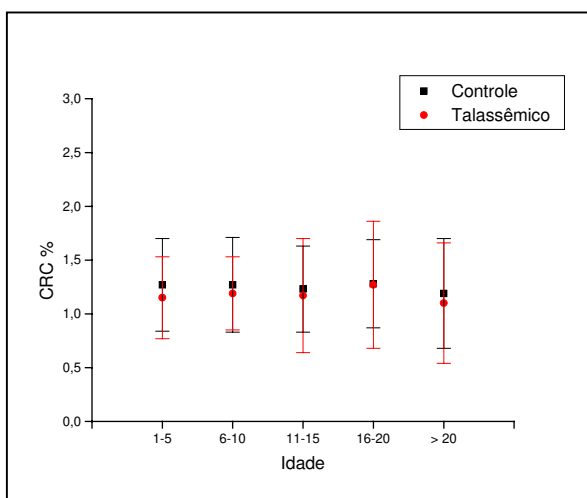


Fig 3. CRC % médio dos grupos, por faixa etária

Tabela 4. Resultados da Análise de Variância (Ret Low –baixa fluorescência, alta maturidade)

Fonte de Variação	g.l.	Soma de Quadrados Tipo III	Quadrado Médio	F	p-valor
Grupo	1	14712.07	14712.07	1.28	0.2579
Faixa	4	63967.25	15991.81	1.40	0.2348
Grupo*Faixa	4	16115.02	4028.75	0.35	0.8428

Grupo	Faixa	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
C	1-5	41	89.18	5.14	77.30	90.30	95.80
	6-10	42	89.75	5.07	77.90	90.20	97.40
	11-15	44	91.00	5.30	77.50	91.95	99.00
	16-20	42	90.01	5.88	74.60	91.50	99.10
	> 20	80	89.61	7.01	73.90	89.10	100.00
T	1-5	27	89.10	6.34	75.10	89.70	97.80
	6-10	18	90.82	3.92	84.40	91.00	95.90
	11-15	16	91.73	5.26	79.40	92.85	99.20
	16-20	20	89.84	6.50	74.90	90.65	100.00
	> 20	40	91.55	6.34	73.80	92.95	100.00

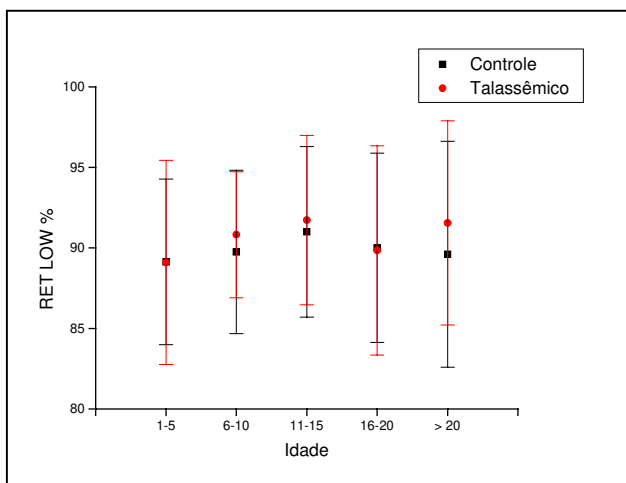


Fig 4. RET LOW % médio dos grupos, por faixa etária

Tabela 5. Resultados da Análise de Variância (Ret Medium – média fluorescência e maturidade)

Fonte de Variação	g.l.	Soma de Quadrados Tipo III	Quadrado Médio	F	p-valor
Grupo	1	17236.20	17236.20	1.51	0.2196
Faixa	4	80666.53	20166.63	1.77	0.1344
Grupo*Faixa	4	16171.36	4042.84	0.35	0.8407

Grupo	Faixa	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
C	1-5	41	8.90	3.88	3.74	8.21	17.70
	6-10	42	8.08	3.75	1.75	8.12	16.80
	11-15	44	7.12	3.75	0.75	6.67	16.40
	16-20	42	7.76	4.30	0.88	7.50	17.60
	> 20	80	7.91	5.37	0.00	8.70	18.40
T	1-5	27	8.46	4.67	1.12	8.58	17.50
	6-10	18	7.47	3.07	3.33	6.54	12.80
	11-15	16	6.75	4.50	0.79	5.70	18.80
	16-20	20	7.97	4.78	0.00	7.96	19.50
	> 20	40	6.50	5.08	0.00	5.01	17.8

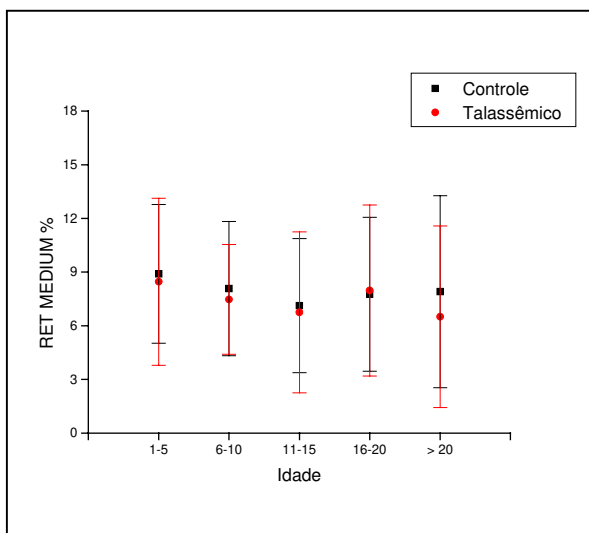


Fig 5. RET MEDIUM % médio dos grupos, por faixa etária

Tabela 6. Resultados da Análise de Variância (Ret HIGH – alta fluorescência, baixa maturidade)

Fonte de Variação	g.l.	Soma de Quadrados Tipo III	Quadrado Médio	F	p-valor
Grupo	1	7523.52	7523.52	0.65	0.4192
Faixa	4	31741.29	7935.32	0.69	0.5993
Grupo*Faixa	4	16675.71	4168.92	0.36	0.8353

Grupo	Faixa	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
C	1-5	41	1.92	1.43	0.00	1.46	5.99
	6-10	42	2.18	1.84	0.00	1.79	6.80
	11-15	44	1.88	2.16	0.00	1.13	10.10
	16-20	42	2.22	1.86	0.00	1.91	8.25
	> 20	80	2.49	2.26	0.00	2.06	8.79
T	1-5	27	2.43	2.48	0.00	2.06	9.96
	6-10	18	1.70	1.45	0.00	1.45	5.93
	11-15	16	1.53	1.20	0.00	1.56	3.29
	16-20	20	2.19	2.05	0.00	1.50	7.10
	> 20	40	1.88	1.74	0.00	1.39	8.42

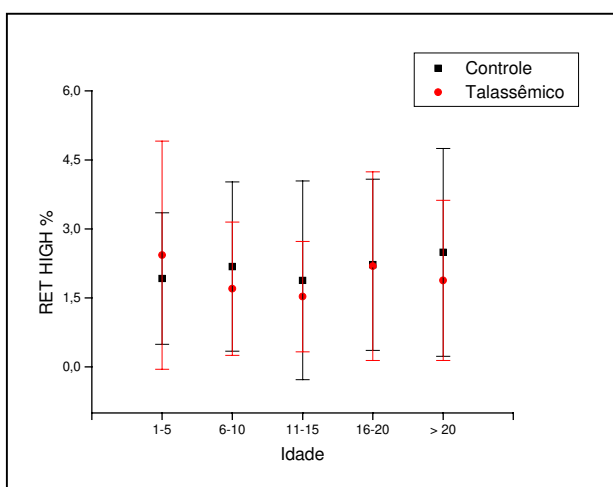


Fig 6. RET HIGH % médio dos grupos, por faixa etária

Tabela 7. Resultados da Análise de Variância (MFI % - Mean Fluorescence Index)

Fonte de Variação	g.l.	Soma de Quadrados Tipo III	Quadrado Médio	F	p-valor
Grupo	1	8529.38	8529.38	0.75	0.3884
Faixa	4	78800.99	19700.24	1.72	0.1443
Grupo*Faixa	4	21161.61	5290.40	0.46	0.7632

Grupo	Faixa	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
C	1-5	41	12.61	3.25	6.13	12.50	19.70
	6-10	42	11.96	3.42	6.47	12.00	19.20
	11-15	44	11.42	3.70	4.81	10.75	20.90
	16-20	42	11.86	3.84	4.67	12.55	21.20
	> 20	80	12.18	4.39	2.97	12.50	22.80
T	1-5	27	12.85	3.69	6.73	12.00	21.50
	6-10	18	11.54	2.28	8.04	11.35	16.30
	11-15	16	10.73	3.45	5.94	9.43	17.60
	16-20	20	12.12	4.30	4.33	11.40	21.30
	> 20	40	11.14	4.46	4.74	9.76	23.40

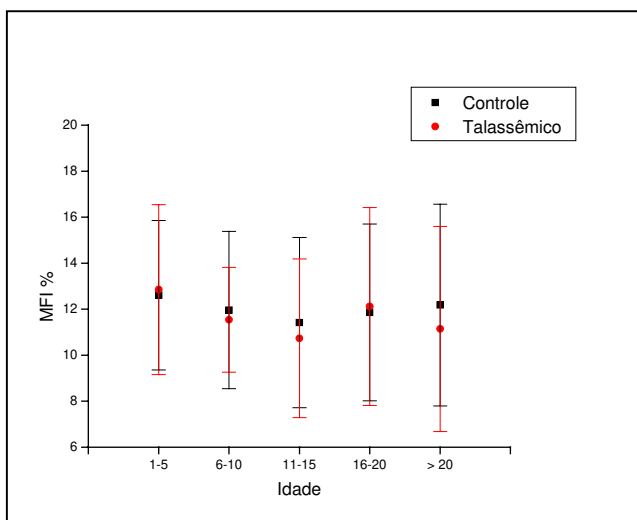


Fig 7. MFI % médio dos grupos, por faixa etária

Tabela 8. Resultados da Análise de Variância (VRM – Volume RET Médio)

Fonte de Variação	g.l.	Soma de Quadrados Tipo III	Quadrado Médio	F	p-valor
Grupo	1	1306252.78	1306252.78	230.13	0.0001
Faixa	4	499216.30	124804.07	21.99	0.0001
Grupo*Faixa	4	39847.93	9961.98	1.76	0.1374

Grupo	Faixa	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
C	1-5	41	93.20	6.34	77.00	94.00	110.00
	6-10	42	95.90	6.46	83.00	95.00	108.00
	11-15	44	99.02	5.16	88.00	99.50	110.00
	16-20	42	101.93	5.03	90.00	101.50	111.00
	> 20	80	101.63	6.13	82.00	102.00	117.00
T	1-5	27	83.56	8.10	71.00	82.00	102.00
	6-10	18	85.17	3.03	80.00	86.00	89.00
	11-15	16	88.56	3.78	80.00	90.00	94.00
	16-20	20	92.10	7.77	72.00	94.00	104.00
	> 20	40	90.48	4.88	82.00	90.00	103.00

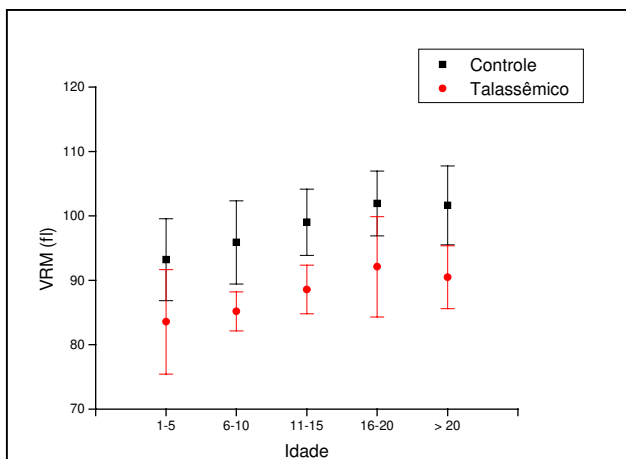


Fig 8. VRM médio dos grupos, por faixa etária

Teste de Tukey - $\alpha = 0.05$

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.				
FAIXA Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits		
16-20 - > 20	16.823	-15.483	49.130	
16-20 - 11-15	37.461	0.054	74.868	***
16-20 - 6-10	84.786	47.379	122.193	***
16-20 - 1-5	116.427	80.156	152.699	***
> 20 - 11-15	20.637	-12.022	53.297	
> 20 - 6-10	67.962	35.303	100.622	***
> 20 - 1-5	99.604	68.251	130.957	***
11-15 - 6-10	47.325	9.613	85.037	***
11-15 - 1-5	78.967	42.380	115.553	***
6-10 - 1-5	31.642	-4.945	68.228	

Tabela 9. Resultados da Análise de Variância (sTfR – Receptor solúvel de transferrina)

Fonte de Variação	g.l.	Soma de Quadrados Tipo III	Quadrado Médio	F	p-valor
Grupo	1	141051.30	141051.30	15.20	0.0001
Faixa	4	631728.24	157932.06	17.01	0.0001
Grupo*Faixa	4	8691.35	2172.83	0.23	0.9191

Grupo	Faixa	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
C	1-5	41	1.90	0.43	1.10	1.80	2.80
	6-10	42	1.69	0.40	0.94	1.68	2.48
	11-15	44	1.47	0.43	0.74	1.43	2.45
	16-20	42	1.42	0.38	0.83	1.36	2.36
	> 20	80	1.42	0.39	0.70	1.35	2.66
T	1-5	27	2.32	0.70	1.40	2.23	4.55
	6-10	18	1.80	0.52	0.68	1.79	2.84
	11-15	16	1.69	0.37	1.05	1.68	2.41
	16-20	20	1.80	0.84	0.90	1.57	3.75
	> 20	40	1.62	0.52	0.96	1.51	2.98

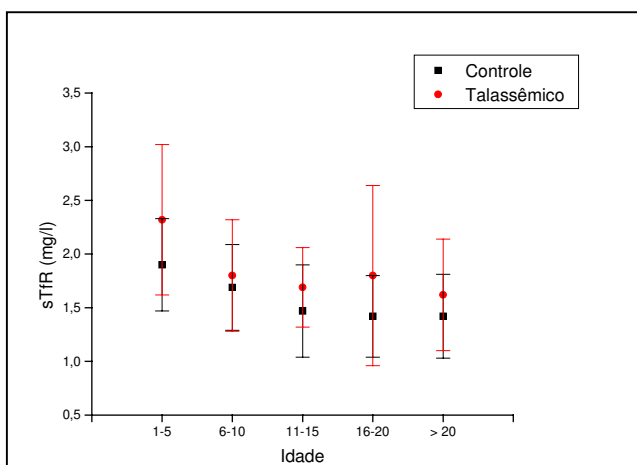


Fig 9. STFR médio dos grupos, por faixa etária

Teste de Tukey - $\alpha = 0.05$

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***

FAIXA Comparison		Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits		
1-5	- 6-10	54.03	7.24	100.81	***
1-5	- 11-15	100.44	53.66	147.23	***
1-5	- 16-20	112.20	65.81	158.58	***
1-5	- > 20	116.02	75.93	156.11	***
6-10	- 11-15	46.42	-1.81	94.64	
6-10	- 16-20	58.17	10.33	106.00	***
6-10	- > 20	61.99	20.23	103.76	***
11-15	- 16-20	11.75	-36.08	59.59	
11-15	- > 20	15.57	-26.19	57.34	
16-20	- > 20	3.82	-37.49	45.14	

Comparação dos grupos fixando faixa

Faixa Etária	C x T (p-valor)
1-5	0.0082
6-10	0.3882
11-15	0.0691
16-20	0.0966
>20	0.0436

Tabela 10. Resultados da Análise de Variância (RMI –RET Maturity Index)

Fonte de Variação	g.l.	Soma de Quadrados Tipo III	Quadrado Médio	F	p-valor
Grupo	1	15381.77	15381.77	1.34	0.2471
Faixa	4	65094.80	16273.70	1.42	0.2262
Grupo*Faixa	4	17409.06	4352.26	0.38	0.8228

Grupo	Faixa	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
C	1-5	41	12.51	6.73	4.43	10.78	29.35
	6-10	42	11.79	6.50	2.70	10.86	28.38
	11-15	44	10.27	6.71	0.97	8.74	28.90
	16-20	42	11.58	7.67	0.89	9.28	33.98
	> 20	80	12.30	9.00	0.00	12.25	35.36
T	1-5	27	12.79	8.39	2.21	11.48	33.10
	6-10	18	10.29	4.84	4.24	9.86	18.45
	11-15	16	9.38	6.59	0.80	7.67	26.05
	16-20	20	11.89	8.56	0.00	10.31	33.58
	> 20	40	9.71	8.26	0.00	7.58	35.53

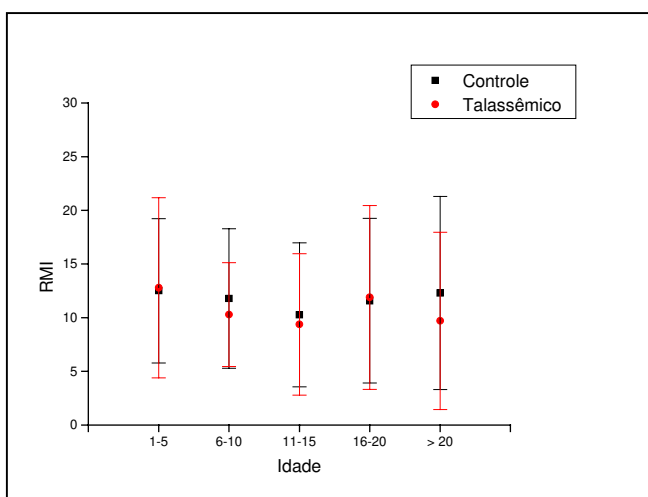


Fig 10. RMI médio dos grupos, por faixa etária

Tabela 11. Resultados da Análise de Variância (RBC - Hemácias)

Fonte de Variação	g.l.	Soma de Quadrados Tipo III	Quadrado Médio	F	p-valor
Grupo	1	635166.55	635166.55	69.53	0.0001
Faixa	4	183516.85	45879.21	5.02	0.0006
Grupo*Faixa	4	19753.08	4938.27	0.54	0.7060

Grupo	Faixa	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
C	1-5	41	4.64	0.38	3.38	4.60	5.29
	6-10	42	4.69	0.36	4.07	4.60	5.47
	11-15	44	4.64	0.32	3.79	4.62	5.33
	16-20	42	4.76	0.38	4.11	4.72	5.79
	> 20	80	4.82	0.40	4.03	4.82	5.85
T	1-5	27	4.92	0.49	3.59	4.97	5.79
	6-10	18	5.00	0.32	4.48	4.95	5.65
	11-15	16	5.05	0.43	4.35	5.02	6.14
	16-20	20	5.16	0.51	4.13	5.26	5.88
	> 20	40	5.34	0.44	4.67	5.29	6.17

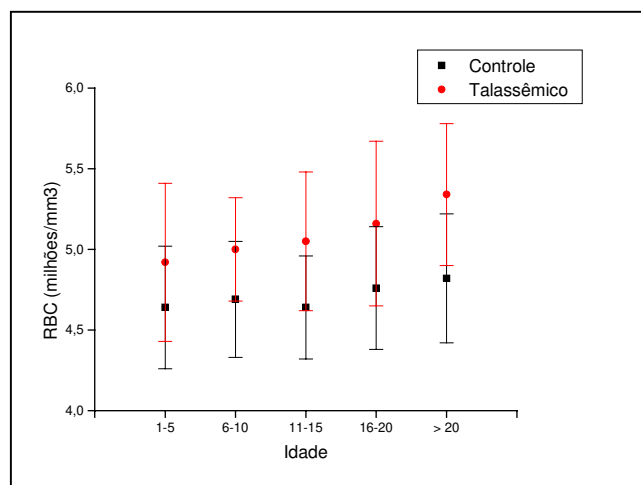


Fig 11. RBC médio dos grupos, por faixa etária

Teste de Tukey - $\alpha = 0.05$

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.					
		Difference			
FAIXA Comparison		Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits		
> 20	- 16-20	23.26	-17.73	64.24	
> 20	- 6-10	45.59	4.16	87.02	***
> 20	- 1-5	46.69	6.92	86.47	***
> 20	- 11-15	53.80	12.37	95.24	***
16-20	- 6-10	22.33	-25.12	69.78	
16-20	- 1-5	23.43	-22.58	69.45	
16-20	- 11-15	30.55	-16.91	78.00	
6-10	- 1-5	1.10	-45.31	47.52	
6-10	- 11-15	8.22	-39.62	56.06	
1-5	- 11-15	7.11	-39.30	53.53	

Tabela 12. Resultados da Análise de Variância (HGB - Hemoglobina)

Fonte de Variação	g.l.	Soma de Quadrados Tipo III	Quadrado Médio	F	p-valor
Grupo	1	184900.50	184900.50	22.99	0.0001
Faixa	4	874392.67	218598.02	27.19	0.0001
Grupo*Faixa	4	25721.67	6430.41	0.80	0.5260

Grupo	Faixa	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
C	1-5	41	12.75	1.00	11.00	12.70	15.10
	6-10	42	13.30	0.93	12.00	13.25	15.50
	11-15	44	13.63	0.92	12.00	13.50	15.50
	16-20	42	14.10	1.06	12.20	13.95	17.00
	> 20	80	14.52	1.08	12.50	14.45	16.80
T	1-5	27	12.08	1.05	11.00	11.60	14.80
	6-10	18	12.89	0.82	12.00	12.80	14.50
	11-15	16	13.40	1.05	12.00	13.20	15.90
	16-20	20	13.50	0.97	12.00	13.35	16.30
	> 20	40	13.70	1.22	12.00	13.25	16.80

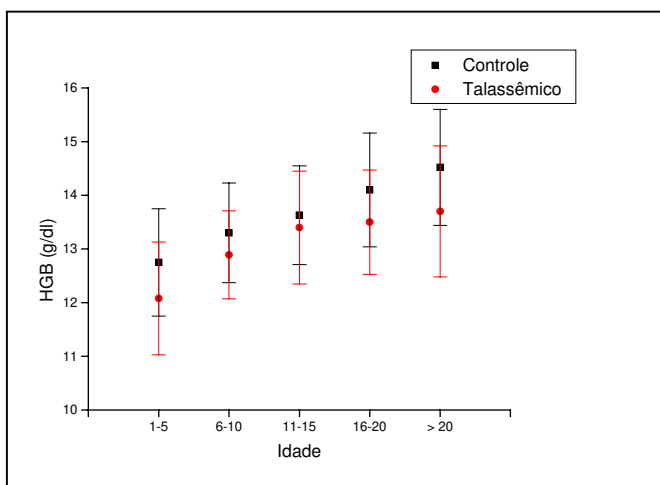


Fig 12. HGB médio dos grupos, por faixa etária

Teste de Tukey - $\alpha = 0.05$

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.					
FAIXA Comparison		Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits		
> 20	- 16-20	24.12	-14.33	62.57	
> 20	- 11-15	52.99	14.12	91.86	***
> 20	- 6-10	91.67	52.80	130.54	***
> 20	- 1-5	144.94	107.62	182.26	***
16-20	- 11-15	28.87	-15.66	73.39	
16-20	- 6-10	67.55	23.03	112.07	***
16-20	- 1-5	120.82	77.65	163.99	***
11-15	- 6-10	38.68	-6.20	83.57	
11-15	- 1-5	91.95	48.41	135.50	***
6-10	- 1-5	53.27	9.72	96.81	***

Tabela 13. Resultados da Análise de Variância (HCT - Hematócrito)

Fonte de Variação	g.l.	Soma de Quadrados Tipo III	Quadrado Médio	F	p-valor
Grupo	1	7429.40	7429.40	0.92	0.3376
Faixa	4	1101926.75	275481.68	34.19	0.0001
Grupo*Faixa	4	22152.01	5538.00	0.69	0.6011

Grupo	Faixa	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
C	1-5	41	37.62	2.99	31.80	37.80	43.60
	6-10	42	39.07	2.73	33.90	38.70	45.10
	11-15	44	40.55	2.49	35.70	40.45	46.10
	16-20	42	41.84	2.95	36.40	42.00	47.90
	> 20	80	43.01	2.88	37.20	42.75	49.60
T	1-5	27	37.23	3.21	32.20	36.90	47.20
	6-10	18	39.38	2.50	35.60	39.55	43.30
	11-15	16	40.76	3.28	34.60	40.90	48.90
	16-20	20	41.23	3.19	36.20	40.60	51.50
	> 20	40	42.35	3.66	36.70	41.40	50.70

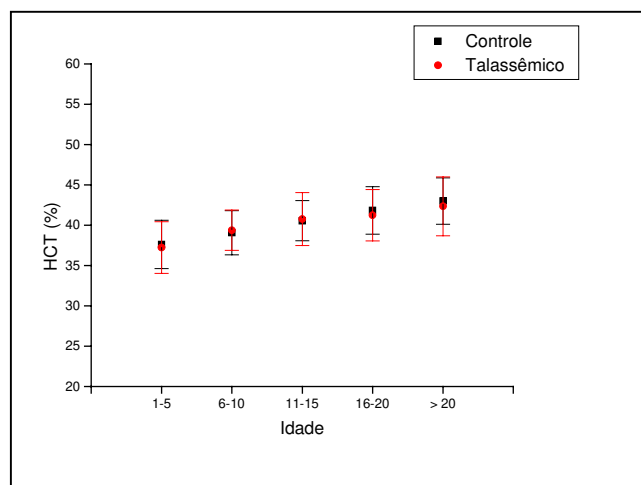


Fig 13. HCT médio dos grupos, por faixa etária

Teste de Tukey - $\alpha = 0.05$

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.				
FAIXA Comparison		Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits	
> 20	- 16-20	31.37	-7.12 69.86	
> 20	- 11-15	62.38	23.46 101.29	***
> 20	- 6-10	110.43	71.51 149.34	***
> 20	- 1-5	157.59	120.24 194.95	***
16-20	- 11-15	31.00	-13.56 75.57	
16-20	- 6-10	79.05	34.49 123.62	***
16-20	- 1-5	126.22	83.01 169.44	***
11-15	- 6-10	48.05	3.12 92.98	***
11-15	- 1-5	95.22	51.63 138.81	***
6-10	- 1-5	47.17	3.58 90.76	***

Tabela 14. Resultados da Análise de Variância (VCM – Volume corpuscular médio)

Fonte de Variação	g.l.	Soma de Quadrados Tipo III	Quadrado Médio	F	p-valor
Grupo	1	1081974.03	1081974.03	214.32	0.0001
Faixa	4	477745.48	119436.37	23.66	0.0001
Grupo*Faixa	4	206990.39	51747.59	10.25	0.0001

Grupo	Faixa	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
C	1-5	41	80.98	4.19	69.60	80.60	90.70
	6-10	42	83.44	3.71	77.30	83.00	91.30
	11-15	44	87.44	3.78	80.60	87.15	97.00
	16-20	42	87.96	3.92	81.00	87.95	96.60
	> 20	80	89.44	3.54	81.60	89.30	97.00
T	1-5	27	76.10	6.33	66.00	74.30	92.80
	6-10	18	78.89	3.48	72.70	79.90	84.50
	11-15	16	80.86	4.06	71.30	80.70	89.80
	16-20	20	80.34	5.53	70.00	80.00	94.70
	> 20	40	79.22	3.56	74.00	79.00	86.00

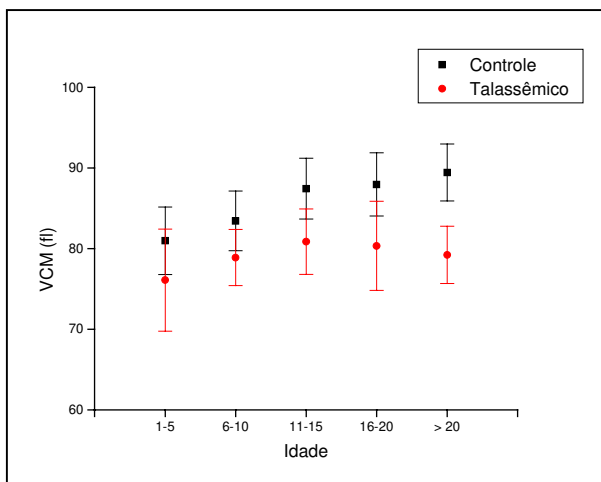


Fig 14. VCM médio dos grupos, por faixa etária

Comparação dos grupos fixando a faixa

Faixa Etária	Controle x Talassêmico p-valor
1-5	0.0039
6-10	0.0002
11-15	0.0001
16-20	0.0001
> 20	0.0001

Comparação das faixas, fixando Grupo – (Controle)

Teste de Tukey - $\alpha = 0.05$

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

FAIXA Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits		
> 20 - 16-20	27.39	-8.44	63.21	
> 20 - 11-15	34.97	-0.31	70.25	
> 20 - 6-10	113.99	78.17	149.81	***
> 20 - 1-5	158.54	122.43	194.64	***
16-20 - 11-15	7.58	-32.97	48.14	
16-20 - 6-10	86.61	45.58	127.63	***
16-20 - 1-5	131.15	89.88	172.42	***
11-15 - 6-10	79.02	38.47	119.58	***
11-15 - 1-5	123.57	82.76	164.37	***
6-10 - 1-5	44.54	3.27	85.81	***

Comparação das faixas, fixando Grupo – (Talassêmico)

Teste de Tukey - $\alpha = 0.05$

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

FAIXA Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits		
11-15 - 16-20	8.56	-62.39	79.50	
11-15 - > 20	29.02	-33.55	91.59	
11-15 - 6-10	33.25	-39.42	105.93	
11-15 - 1-5	58.50	-8.23	125.24	
16-20 - > 20	20.46	-37.46	78.39	
16-20 - 6-10	24.70	-44.02	93.42	
16-20 - 1-5	49.95	-12.45	112.35	
> 20 - 6-10	4.23	-55.80	64.27	
> 20 - 1-5	29.48	-23.20	82.17	
6-10 - 1-5	25.25	-39.11	89.61	

Tabela 15. Resultados da Análise de Variância (HCM – HGB corpuscular média)

Fonte de Variação	g.l.	Soma de Quadrados Tipo III	Quadrado Médio	F	p-valor
Grupo	1	1561697.18	1561697.18	364.01	0.0001
Faixa	4	307291.01	76822.75	17.91	0.0001
Grupo*Faixa	4	173803.75	43450.93	10.13	0.0001

Grupo	Faixa	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
C	1-5	41	27.43	1.57	22.50	27.30	30.80
	6-10	42	28.41	1.44	26.30	28.10	31.60
	11-15	44	29.38	1.37	26.90	29.25	32.20
	16-20	42	29.64	1.31	27.10	29.75	32.50
	> 20	80	30.18	1.27	26.90	30.30	32.80
T	1-5	27	24.70	2.32	20.80	24.20	30.60
	6-10	18	25.81	1.14	23.90	25.55	27.40
	11-15	16	26.56	1.07	24.50	26.75	28.40
	16-20	20	26.28	1.94	21.60	26.25	29.80
	> 20	40	25.66	1.32	23.00	25.50	28.60

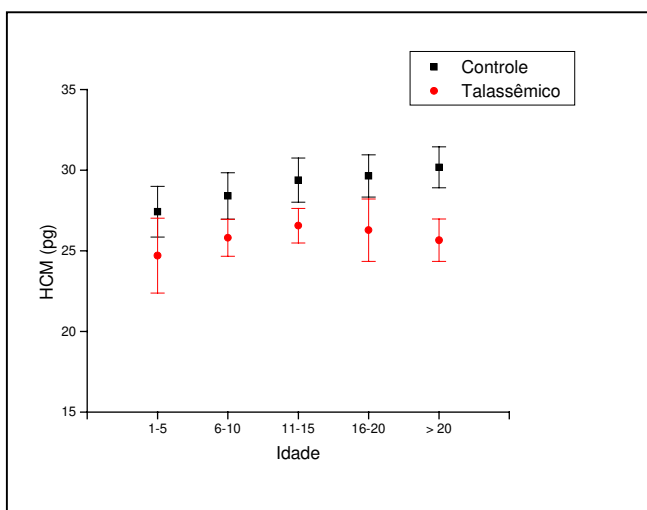


Fig 15. HCM médio dos grupos, por faixa etária

Comparação dos grupos fixando a faixa

Faixa Etária	Controle x Talassêmico p-valor
1-5	0.0001
6-10	0.0001
11-15	0.0001
16-20	0.0001
> 20	0.0001

Comparação das faixas, fixando Grupo – (Controle)

Teste de Tukey - $\alpha = 0.05$

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

FAIXA Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits		
> 20 - 16-20	26.86	-8.51	62.24	
> 20 - 11-15	40.09	5.24	74.93	***
> 20 - 6-10	89.92	54.55	125.30	***
> 20 - 1-5	136.65	101.00	172.31	***
16-20 - 11-15	13.22	-26.83	53.27	
16-20 - 6-10	63.06	22.55	103.57	***
16-20 - 1-5	109.79	69.03	150.55	***
11-15 - 6-10	49.84	9.79	89.89	***
11-15 - 1-5	96.57	56.27	136.86	***
6-10 - 1-5	46.73	5.97	87.49	***

Comparação das faixas, fixando Grupo – (Talassêmico)

Teste de Tukey - $\alpha = 0.05$

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

FAIXA Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits		
11-15 - 16-20	0.96	-55.70	57.62	
11-15 - 6-10	28.70	-29.34	86.74	
11-15 - > 20	31.34	-18.63	81.31	
11-15 - 1-5	45.85	-7.45	99.14	
16-20 - 6-10	27.74	-27.14	82.62	
16-20 - > 20	30.39	-15.87	76.65	
16-20 - 1-5	44.89	-4.95	94.73	
6-10 - > 20	2.65	-45.30	50.59	
6-10 - 1-5	17.15	-34.25	68.55	
> 20 - 1-5	14.50	-27.57	56.58	

Tabela 16. Resultados da Análise de Variância (RDW – Índice de anisocitose eritrocitária)

Fonte de Variação	g.l.	Soma de Quadrados Tipo III	Quadrado Médio	F	p-valor
Grupo	1	366790.54	366790.54	43.20	0.0001
Faixa	4	560592.63	140148.15	16.51	0.0001
Grupo*Faixa	4	118383.22	29595.80	3.49	0.0083

Grupo	Faixa	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
C	1-5	41	14.01	1.14	12.00	14.00	17.30
	6-10	42	13.58	1.10	12.10	13.35	16.60
	11-15	44	13.51	1.07	11.40	13.30	15.90
	16-20	42	13.80	0.88	12.70	13.65	15.70
	> 20	80	14.21	1.23	11.90	13.90	17.70
T	1-5	27	16.03	3.13	13.00	15.00	27.40
	6-10	18	13.76	0.71	12.50	13.80	14.80
	11-15	16	14.05	1.38	12.60	13.85	17.10
	16-20	20	15.13	2.72	13.10	14.60	26.00
	> 20	40	16.19	1.51	13.40	16.10	20.90

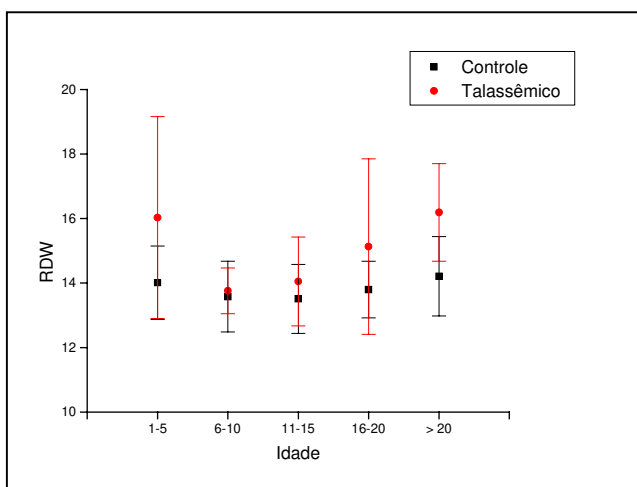


Fig 16. RDW médio dos grupos, por faixa etária

Comparação dos grupos fixando a faixa

Faixa Etária	Controle x Talassêmico p-valor
1-5	0.0005
6-10	0.4095
11-15	0.1829
16-20	0.0012
> 20	0.0001

Comparação das faixas, fixando Grupo – (Controle)

Teste de Tukey - $\alpha = 0.05$

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

FAIXA Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits		
> 20 - 1-5	12.07	-39.50	63.64	
> 20 - 16-20	31.82	-19.34	82.98	
> 20 - 6-10	51.87	0.71	103.03	***
> 20 - 11-15	58.92	8.53	109.32	***
1-5 - 16-20	19.75	-39.20	78.70	
1-5 - 6-10	39.80	-19.15	98.74	
1-5 - 11-15	46.85	-11.43	105.14	
16-20 - 6-10	20.05	-38.54	78.64	
16-20 - 11-15	27.10	-30.82	85.02	
6-10 - 11-15	7.06	-50.86	64.98	

Comparação das faixas, fixando Grupo – (Talassêmico)

Teste de Tukey - $\alpha = 0.05$

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

FAIXA Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits		
> 20 - 1-5	50.71	-3.96	105.37	
> 20 - 16-20	79.49	19.38	139.60	***
> 20 - 11-15	145.45	80.53	210.37	***
> 20 - 6-10	155.57	93.27	217.86	***
1-5 - 16-20	28.78	-35.97	93.53	
1-5 - 11-15	94.74	25.50	163.99	***
1-5 - 6-10	104.86	38.07	171.65	***
16-20 - 11-15	65.96	-7.65	139.58	
16-20 - 6-10	76.08	4.77	147.39	***
11-15 - 6-10	10.12	-65.29	85.53	

Tabela 17. Resultados da Análise de Variância (Ferritina)

Fonte de Variação	g.l.	Soma de Quadrados Tipo III	Quadrado Médio	F	p-valor
Grupo	1	269.98	269.98	0.03	0.8646
Faixa	4	715632.94	178908.23	19.30	0.0001
Grupo*Faixa	4	29744.45	7436.11	0.80	0.5244

Grupo	Faixa	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
C	1-5	41	39.43	21.10	10.90	37.00	105.00
	6-10	42	42.39	28.84	12.20	29.85	126.00
	11-15	44	54.24	37.52	12.50	48.55	255.00
	16-20	42	59.55	58.19	11.80	33.95	261.00
	> 20	80	116.70	80.95	10.00	102.00	334.00
T	1-5	27	39.16	22.63	10.00	35.30	94.40
	6-10	18	43.12	26.29	18.10	28.20	100.00
	11-15	16	42.84	18.35	10.70	44.55	71.60
	16-20	20	64.07	44.47	10.70	51.80	164.00
	> 20	40	101.37	80.01	10.00	89.75	351.00

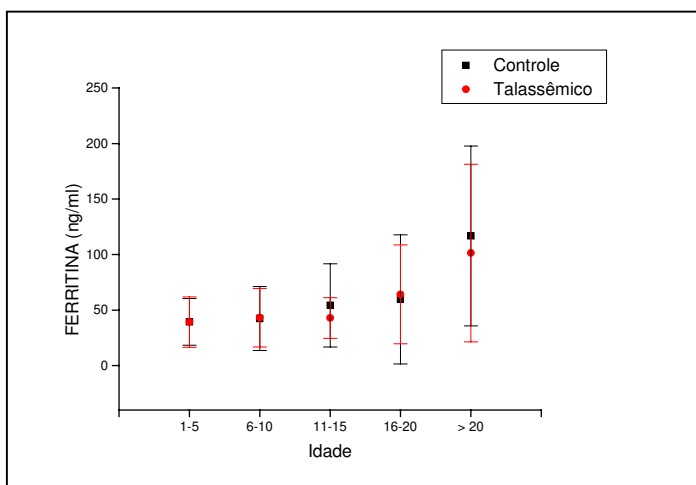


Fig 17. Ferritina média dos grupos, por faixa etária

Teste de Tukey - $\alpha = 0.05$

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.					
FAIXA Comparison		Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits		
> 20	- 11-15	76.96	35.23	118.70	***
> 20	- 16-20	82.59	41.31	123.88	***
> 20	- 6-10	112.92	71.18	154.66	***
> 20	- 1-5	116.52	76.45	156.58	***
11-15	- 16-20	5.63	-42.17	53.44	
11-15	- 6-10	35.96	-12.24	84.15	
11-15	- 1-5	39.55	-7.20	86.31	
16-20	- 6-10	30.33	-17.48	78.13	
16-20	- 1-5	33.92	-12.43	80.28	
6-10	- 1-5	3.60	-43.16	50.35	

Tabela 18. Resultados da Análise de Variância (EPO - eritropoietina)

Fonte de Variação	g.l.	Soma de Quadrados Tipo III	Quadrado Médio	F	p-valor
Grupo	1	3091.48	3091.48	0.32	0.5711
Faixa	4	95835.65	23958.91	2.49	0.0430
Grupo*Faixa	4	47010.74	11752.68	1.22	0.3011

Grupo	Faixa	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
C	1-5	41	10.15	5.20	4.00	9.20	29.20
	6-10	31	10.23	5.27	4.60	9.40	31.10
	11-15	28	8.15	3.89	3.10	7.45	18.60
	16-20	42	7.81	3.04	2.20	7.50	15.00
	> 20	80	10.56	6.18	2.80	9.20	33.10
T	1-5	27	11.16	5.43	3.70	10.30	29.90
	6-10	18	8.79	5.91	4.00	7.40	29.60
	11-15	16	10.04	6.70	5.00	7.80	31.20
	16-20	20	9.85	6.61	4.50	8.05	32.90
	> 20	40	10.85	6.28	2.60	9.50	27.70

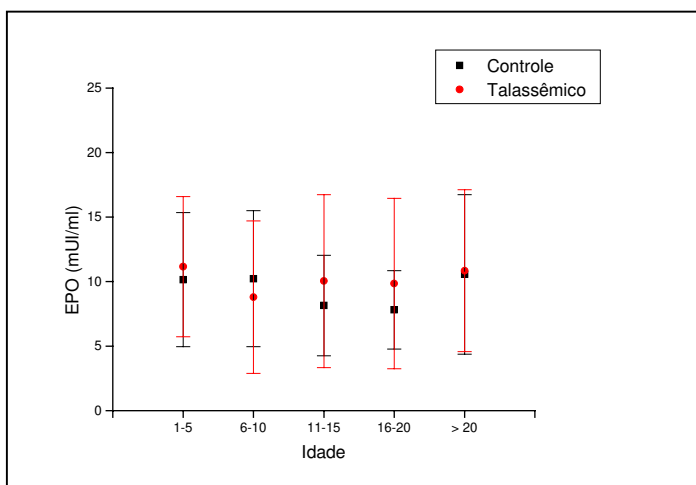


Fig 18. EPO médio dos grupos, por faixa etária

Teste de Tukey - $\alpha = 0.078$

Comparisons significant at the 0.078 level are indicated by ***.				
FAIXA Comparison		Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits	
1-5	- > 20	8.55	-29.72	46.83
1-5	- 6-10	23.45	-23.81	70.70
1-5	- 16-20	44.32	0.04	88.60
1-5	- 11-15	45.51	-3.28	94.30
> 20	- 6-10	14.89	-27.86	57.65
> 20	- 16-20	35.77	-3.68	75.21
> 20	- 11-15	36.96	-7.49	81.40
6-10	- 16-20	20.87	-27.33	69.08
6-10	- 11-15	22.06	-30.31	74.44
16-20	- 11-15	1.19	-48.52	50.90

Referências Bibliográficas

- Conover, W. J. (1971), *Practical Nonparametric Statistics*. New York: John Wiley & Sons.

Total de páginas: 462.

- Montgomery, D. C. (1991), *Design and Analysis of Experiments*. New York: John Wiley & Sons, 3rd ed. Total de páginas: 649.

Os programas computacionais utilizados:

- The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 8.02.

SAS Institute Inc, 1999-2001, Cary, NC, USA.

- Microcal Origin, versão 5.0.

Microcal Software Inc, 1991-1997, Northampton, MA, USA.