

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL PARA TALASSEMIAS

Sarita Perez Vargas

Especialização em Análises Clínicas pelo Centro
Universitário de Maringá - CESUMAR.

Mirian Ueda Yamagushi

Mestre em Análises Clínicas; Docente do curso
de Especialização em Análises Clínicas pelo
Centro Universitário de Maringá - CESUMAR.
E-mail: labchagas@wnet.com.br

RESUMO: As hemoglobinopatias são distúrbios sanguíneos herdados recessivamente e promovem alterações da parte globínica da hemoglobina; essas mudanças conferem características físico-químicas à molécula da hemoglobina que podem ser detectáveis por exames laboratoriais. Levando em consideração a gravidade de certas formas de talassemias e a sua alta incidência populacional, o presente trabalho teve como objetivo demonstrar formas de diagnóstico laboratorial dessa doença e destacar a importância da associação de alguns exames para o diagnóstico seguro da talassemia, sendo alguns destes exames de triagem e outros de confirmação.

PALAVRAS-CHAVE: Talassemia; Hemoglobinopatias; Diagnóstico.

LABORATORIAL DIAGNOSIS FOR THALASSEMIAS

ABSTRACT: The hemoglobinopathy are recessively sanguine disturbances that promote alterations of globin part of the hemoglobin, these changes give the hemoglobin molecule the physical chemistries characteristics that might be detectable through lab exams. Considering the seriousness of certain ways of thalassemia and its high populational incidence, the actual work had in its objective to show ways of the lab diagnosis of this disease and finally it was observed the importance of the association of some exams to the safe diagnosis of thalassemia, being some of them of selection and others of confirmation.

KEY-WORDS: Thalassemia; Hemoglobinopathy; Diagnosis.

INTRODUÇÃO

A hemoglobina é uma estrutura complexa formada pela parte proteica, a globina, e a parte não-proteica, o grupo heme. A hemoglobina normal do adulto é formada por dois pares de cadeias proteicas denominadas de alfa, beta, gama e delta (ROBBINS et al., 2000; VALLADA, 2002).

As hemoglobinopatias são distúrbios sanguíneos herdados recessivamente em que existe alteração da parte globínica da hemoglobina; essas alterações podem ser estruturais resultantes da sequência da cadeia polipeptídica da globina, como podem ser alteração de uma ou de várias cadeias de globina, nesta última é que se enquadram as talassemias. As mudanças conferem características físico-químicas anormais à molécula da hemoglobina, geralmente detectáveis por técnicas especiais (ORLANDO et al., 2000; ROBBINS et al., 2000; VALLADA, 2002; LORENZI et al., 2003; BARROS et al., 2006).

A talassemia, por ser uma doença que primeiro surgiu nos países banhados pelo mar do Mediterrâneo, recebeu a denominação *talassa* que significa mar, e *emia*, de sangue, sendo também conhecida por "Anemia de Cooley", por ter sido o primeiro pesquisador a descrevê-la, em 1925. Antigamente, essa doença era restrita a áreas tropicais e

subtropicais, uma explicação para isso seria uma proteção que portadores heterozigotos talassêmicos tinham contra infecções endêmicas causadas pelo *Plasmodium* da malária (ANGASTINIOTIS et al., 1995; ROBBINS et al., 2000; TORRES; BONINI-DOMINGOS, 2005).

Atualmente, a talassemia disseminou-se para outras regiões pelas migrações humanas e há registro em lugares como Oriente Médio, África, alguns países asiáticos, China, continente americano e norte da Europa (ZAGO, 1986; ANGASTINIOTIS et al., 1995; LEONELI et al., 2000; ROBBINS et al., 2000; LORENZI et al., 2003).

No Brasil, não foi diferente, há registros de várias hemoglobinopatias, em que o processo de colonização teve grande influência na dispersão dos genes causadores dela, manifestando-se mais frequentemente de acordo com as etnias; as beta talassemias, por exemplo, deve-se, em boa parte, aos imigrantes italianos (NAOUM, 1984; ZAGO, 1986; WAGNER et al., 2005).

As hemoglobinas humanas normais são hemoglobina A₁ (Hb A₁) constituída pelos pares $\alpha_2\beta_2$ que se encontram em maior quantidade no organismo, cerca de 97%; hemoglobina A₂ (Hb A₂) constituída pelos pares $\alpha_2\delta_2$ que compõem o restante da hemoglobina do adulto, cerca de 3%. A hemoglobina fetal constituída pelos pares $\alpha_2\gamma_2$ está presente durante a vida intra-uterina e nos primeiros meses de vida, porém, existem hemoglobinas variantes que causam diferentes doenças, dentre elas: Hemoglobina S (HbS), hemoglobina D (HbD), hemoglobina A Lepore (HbA Lepore) hemoglobina AG (Hb AG) e a associação entre elas que podem confundir o diagnóstico com talassemia (NAOUM et al., 1985; ROBBINS et al., 2000; VALLADA, 2002).

Existem dois tipos de talassemia, a alfa talassemia que se caracteriza por redução ou ausência na síntese da cadeia alfa e a beta talassemia que consiste na redução ou na ausência total de cadeias beta da hemoglobina (RAVEL, 1995; ROBBINS et al., 2000; DUCATTI et al. 2001; VALLADA, 2002).

As manifestações clínicas variam dependendo do tipo de talassemia, ou seja, do defeito genotípico que o indivíduo apresenta, se é heterozigoto ou homozigoto, desde formas assintomáticas e discreta anemia a graves sintomas, podendo ser até fatal (ROBBINS et al., 2000; RAMALHO, 2003; BARROS et al., 2006). No caso de beta talassemia, as formas mais graves são causadas em indivíduos homozigotos, portadores de *talassemia major* e apresentam anemia grave que depende de transfusão de sangue; já nos heterozigotos, portadores de *talassemia minor*, há síntese de cadeias beta globínicas normais e, com isto, o indivíduo afetado, geralmente, permanece assintomático ou com discreta anemia. Uma terceira forma clínica da beta talassemia, que causa anemia grave, porém não chega a precisar de transfusão sanguínea, é a beta talassemia intermediária (ROBBINS et al., 2000; VALLADA, 2002).

As talassemias alfa podem ser classificadas em quatro tipos de acordo com a deleção de cadeias alfa em:

- a. portador silencioso - com perda de um único gene de alfa globina, são indivíduos assintomáticos e não apresentam anemia;
- b. traço alfa talassêmico - com perda de dois genes alfa com ausência ou discreta anemia (quadro clínico semelhante à beta *talassemia minor*);
- c. doença da hemoglobina H - apenas um gene alfa é funcional, apresenta anemia moderadamente grave, mas sem precisar de transfusão de sangue;

d. hidropsia fetal - perda dos quatro genes alfa (hemoglobina de Bart) pode levar à morte do feto (ROBBINS et al., 2000).

Como a talassemia é uma doença autossômica recessiva, o indivíduo talassêmico herda um gene anormal do pai e outro da mãe, portanto os pais possuem traço talassêmico (são heterozigotos) (NAOUM et al., 1985; ORLANDO et al., 2000) que geralmente é assintomático e a pessoa nem sabe que possui, e o diagnóstico destes indivíduos também é importante porque, embora não apresentam quadro clínico da talassemia, eles passam aos seus filhos a doença que, como visto acima, pode ser bastante grave e, por este motivo, o correto diagnóstico destes indivíduos heterozigotos permite a orientação e esclarecimento quanto à possibilidade de se ter um filho portador da talassemia (NAOUM et al., 1985; ORLANDO et al., 2000; DUCATTI et al., 2001).

As hemoglobinopatias são polimorfismos genéticos humanos, ou seja, são alterações genéticas com alta frequência populacional, o tratamento precoce comprovadamente aumenta a sobrevivência dos afetados e melhora a sua qualidade de vida, mas não possibilita a sua cura clínica, daí a importância do diagnóstico precoce e principalmente seguro (ORLANDO et al., 2000; RAMALHO et al., 2002).

O presente trabalho pretende mostrar as formas de diagnóstico laboratorial de talassemia, levando em consideração a gravidade de certas formas dessa doença e a alta incidência de hemoglobinopatias, entre elas, alfa e beta heterozigotos talassêmicos (DUCATTI, 2001; RAMALHO et al., 2003; LISOT; SILLA, 2004; WAGNER et al., 2005), o correto diagnóstico é de fundamental importância, pois as hemoglobinopatias, dentre elas, as talassemias, podem se tornar grande problema de saúde pública (DUCATTI et al., 2001; BACKES et al., 2005; BARROS et al., 2006).

2 DESENVOLVIMENTO

Os exames laboratoriais podem ser divididos em testes de triagem e testes de confirmação. Os testes de triagem incluem: análise morfológica das hemácias, índices hematimétricos, investigação das hemoglobinas do paciente por meio de eletroforese de hemoglobina em pH alcalino e resistência osmótica em solução de cloreto de sódio a 0,36% (específico para triagem de talassemia). Dentre os testes de confirmação estão: eletroforese em pH ácido (com a conseguinte dosagem de hemoglobina A₁ e A₂), isoeletroforese, cromatografia líquida de alta pressão - HPLC, estudo molecular (DNA - ácido desoxido ribonucléico), além da avaliação de ferro sérico e ferritina (LEONELI et al., 2000; ZAMARO et al., 2002; LISOT; SILLA, 2004; ONDEI et al., 2005).

O hemograma é importante porque além dos índices hematimétricos fornecidos pelo exame que expressam informações valiosas para a triagem de hemoglobinas variantes, geralmente, o VCM (volume corpuscular médio) e o HCM (hemoglobina corpuscular média) estão reduzidos; a visualização ao microscópico do esfregaço sanguíneo também auxilia bastante, por exemplo, a beta *talassemia major* revela anisocitose pronunciada, poiquilocitose e numerosos eritrócitos pequenos e praticamente incolores; na beta *talassemia minor* mostra hipocromia, microcitose, pontilhado basófilo, células em alvo. No caso de alfa talassemia, observam-se corpos de Heinz e agregados de hemoglobina H (HbH) (LEONELI et al., 2000; ROBBINS et al., 2000; MELO et al., 2002; VALLADA,

2002; ZAMARO et al., 2002). Contudo, esses parâmetros analisados isoladamente não são suficientes para o diagnóstico de talassemia, havendo a necessidade de exames específicos (MELO et al., 2002).

Como já mencionado, na anemia presente na talassemia, seja ela beta ou alfa, os eritrócitos apresentam-se microcíticos e hipocrômicos. Essas alterações hematológicas são seguidamente interpretadas como indicadores de deficiência de ferro, isso porque, na anemia ferropênica, podem-se visualizar células microcíticas e hipocrômicas no esfregaço sanguíneo (ROBBINS et al., 2000). A importância de diferenciar o caráter talassêmico da deficiência de ferro deve-se ao fato de que esta última se beneficia da terapia com ferro, enquanto a primeira pode ser agravada por esse tratamento. Pelo hemograma apenas, não é possível apontar tal diferença. Para essa elucidação, faz-se necessário a dosagem de ferro sérico e ferritina (VIANA-BARACIOLI et al., 2001; ROBBINS et al., 2000; GEBAUER et al., 2005; WAGNER et al., 2005).

A anemia ferropriva apresenta difícil diagnóstico presuntivo pelos índices hematimétricos (MELO et al., 2002), portanto, somente estes índices não são suficientes para diferenciar a anemia ferropênica da beta *talassemia minor*, da anemia não-ferropênica e não-talassêmica e essa diferenciação se faz necessária para que uma anemia não seja erroneamente diagnosticada, uma vez que, em muitas partes do mundo, a frequência de beta talassemia como causa de anemia microcítica é menor apenas em anemia por carência de ferro (PEARSON et al., 1973; MELO et al., 2002; WAGNER, 2005).

Após afastar a suspeita de anemia ferropênica, um exame laboratorial para diagnóstico é a eletroforese em pH alcalino, mais frequentemente efetuada em acetato de agarose ou celulose, que se caracteriza como a principal forma de qualificação e quantificação de hemoglobinas normais e anormais; entretanto, a caracterização de determinados tipos de hemoglobina anormal pode se tornar difícil, pois, na maioria dessas posições, existem descritos mais de um tipo de hemoglobina, por este motivo, recomenda-se a eletroforese também em pH ácido como meio de diferenciação, já que, neste último, há frações de hemoglobinas que migram mais rapidamente ou mais lentamente, ficando em posição diferente do ocorrido no pH alcalino (RAVEL, 1995; LEONELI et al., 2000; VALLADA, 2002; ZAMARO et al., 2002).

O diagnóstico de uma anemia ferropênica se dá por meio de eletroforese de hemoglobina normal, ferritina inferior aos valores de referência para o sexo e idade, beta *talassemia minor*, quando a eletroforese de hemoglobina apresentar elevação da proporção de HbA₂, mas com ferritina normal, e uma anemia não-ferropriva e não-beta talassêmica quando a eletroforese de hemoglobina e a dosagem de ferritina encontram-se normais; sendo estes exames suficientes para a diferenciação destas três anemias (MELO et al., 2002).

Alguns estudos revelam que, para triagem de beta talassemia, pode-se utilizar valores aumentados de HbA₂ e, ainda, que valores normais de HbA₂ e valores limítrofes para os índices hematimétricos não afastam ou não são suficientes para afastar a presença dessa doença (METAXOTOU-MAVROMATI et al., 1988; GASPERINI et al., 1993; FORTOVA et al., 1995).

A confirmação da alfa talassemia deve ser realizada de forma cuidadosa e com a utilização de diferentes metodologias. A eletroforese em pH alcalino permite a visualização de bandas de Hb H, sugerindo alfa talassemia, a suspeita pode ser confirmada pela pesquisa intraeritrocitária de Hb H em

amostras coradas com azul de cresil brilhante a 1% (NAOUM, 1985; TOMÉ-ALVES, 2000; DUCATTI et al., 2001).

A eletroforese de focalização isoeétrica permite separação muito satisfatória das principais hemoglobinas anormais, bem como de algumas variantes raras, já que não existe um único método atualmente disponível capaz de identificar todas as numerosas variantes de hemoglobinas identificadas. Por este método, há como observar a presença da HbS e de outras variantes como a HbD e Hb Lepore, que podem confundir o diagnóstico de talassemia (RAVEL, 1995; NAOUM et al. 2002; ZAMARO et al., 2002; ONDEI et al., 2005; BARROS et al., 2006).

Para a identificação das hemoglobinas variantes e um diagnóstico seguro, é fundamental a associação dos métodos eletroforéticos clássicos com análise cromatográfica (ONDEI et al., 2005).

Além da eletroforese, outra forma de detecção qualitativa e quantitativa de hemoglobinas é a cromatografia líquida de alta pressão, também com bons resultados para a separação das frações de hemoglobina e utilizado como método de diagnóstico de hemoglobinopatias (ZAMARO et al., 2002; ONDEI et al., 2005). A cromatografia líquida de alta performance fornece subsídios adicionais para a caracterização dos mutantes de hemoglobina, evidenciando tempos de retenção de amostras com suspeitas de HbAS, HbAD-Los Angeles, HbA Lepore, HbAG e interação HbS/beta talassemia, por exemplo, e todas apresentam padrão de migração similar em eletroforese alcalina (RAVEL, 1995; ZAMARO et al., 2002).

Há também técnicas como o desmembramento do DNA. Esta técnica é bastante segura e detecta a alteração em nível de cromossomo, já que as cadeias beta são codificadas por dois genes de beta-globina, cada um localizado em um dos dois cromossomos 11, e os dois pares de genes funcionais da alfa globina localizam-se no cromossomo 16, realizado por laboratórios de pesquisa e não, rotineiramente, em laboratório de análises clínicas (RAVEL, 1995; ROBBINS et al., 2000; LORENZI et al., 2003). Por meio do mesmo método do DNA, é possível realizar o diagnóstico pré-natal pela análise de DNA de uma amostra de biópsia de vilosidade coriônica com oito a dez semanas de gestação ou de células do líquido amniótico por amniocentese com 16 a 18 semanas (RAVEL, 1995; ROBBINS et al., 2000), cujo exame pode ser feito quando houver possibilidade de a criança ter talassemia, caso os pais possuam hemoglobinas variantes.

Quando houver dúvidas acerca do genótipo do paciente, para a correta caracterização e confirmação diagnóstica, pode ser estudado o sangue dos pais e outros parentes próximos como irmãos do indivíduo com suspeita de algum tipo de hemoglobinopatia. O estudo dos parentes serve para auxiliar na identificação do genótipo do suspeito de ser portador de alguma anemia hereditária, como também para o diagnóstico desses parentes como portadores de hemoglobinas variantes (NAOUM et al., 1985; ONDEI et al., 2005).

Muitos laboratórios de rotina não estão preparados para a correta identificação das hemoglobinas variantes, estas não podem ser identificadas apenas pelos métodos eletroforéticos usuais, uma vez que a co-migração de isoformas de hemoglobinas em eletroforese em pH alcalino sugere pesquisa mais detalhada, e este procedimento é o mais rotineiramente utilizado em laboratório (ZAMARO et al., 2002; ONDEI et al., 2005). É importante uma tecnologia adequada para o diagnóstico, utilizando vários testes laboratoriais seletivos e de confirmação, dados clínicos e estudo familiar (ORLANDO et al., 2000).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pela análise do sangue do paciente e de seus familiares é obtido o diagnóstico, caso seja necessário. Os exames laboratoriais geralmente utilizados são: hemograma com estudo morfológico das hemácias, índices hematimétricos, investigação das hemoglobinas do paciente por meio de eletroforese de hemoglobina em diferentes pHs, isoeletroforese, cromatografia líquida de alta pressão-HPLC, estudo do DNA, além da avaliação de ferro sérico e ferritina, sendo importante o correto diagnóstico das talassemias, para os devidos procedimentos que incluem tratamento das formas que causam sintomas e, no caso de heterozigose, o correto aconselhamento genético.

REFERÊNCIAS

- ANGASTINIOTIS, M. et al. Prevention and control of haemoglobinopathies. **Bull Who**, v. 73, p. 375-386, 1995.
- BACKES, C. E. et al. Triagem neonata como um problema de saúde pública. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 27, n. 1, jan./mar. 2005.
- BARROS, A. K. L. et al. Estudo das hemoglobinopatias no Laboratório Municipal de Saúde Pública do Recife-PE. **NewsLab**, v. 74, p. 92-106, 2006.
- DUCATTI, R. P. et al. Investigação de hemoglobinopatias em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 23, p. 23-29, 2001.
- FORTOVA, H. et al. Diagnosis of beta-thalassemia on the basis of Hb A2 determination. **Vnitr Lek**, v. 41, p. 302-306, 1995.
- GASPERINI, D. et al. Normal individuals with high HB A2 levels. **Br. J. Haematol**, v. 84, p. 166-168, 1993.
- GEBAUER, D. L. P. et al. Alterações hematológicas e dos níveis de ferro sérico em gestantes do Centro Municipal de Saúde de Ijuí (RS). **Infarma**, v. 17, n. 7/9, 2005.
- LEONELI, G. G. et al. Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnóstica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, p. 396-403, 2000.
- LISOT, C. L. A.; SILLA, L. M. R. Triagem de hemoglobinopatias em doadores de sangue de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil: prevalência em áreas de colonização italiana. **Caderno Saúde Pública**, v. 20, n. 6, nov./dez. 2004.
- LORENZI, T.F. et al. Anemias. In: MANUAL DE hematologia: propedêutica e clínica. 3. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. p.63-69.
- MELO, M. R. et al. Uso de índices hematimétricos no diagnóstico diferencial de anemias microcíticas: uma abordagem a ser adotada? **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 3, n. 48, jul./set. 2002.
- METAXOTOU-MAVROMATI, A. et al. Clinical haematological and genetic studies of type 2 normal Hb A2 beta thalassemia. **J. Med. Genet.**, v. 25, p. 195-199, 1988.
- NAOUM, P. C. Anemias imigrantes, origem das anemias hereditárias no Brasil. **Ciência Hoje**, v. 3, set./out. 1984.
- _____. et al. Detecção e conscientização de portadores de hemoglobinopatias nas regiões de São José do Rio Preto e Presidente Prudente, SP (Brasil). **Revista Saúde Pública**, v. 19, p. 364-373, 1985.
- _____. HD/Talassemia beta associada à anemia crônica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 24, n. 1, mar. 2002.
- ONDEI, L. S. et al. A importância do diagnóstico clássico na identificação de variantes de hemoglobina. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 27, p. 72-74, 2005.
- ORLANDO, G. M. et al. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, p. 111-121, 2000.
- PEARSON, H. A. et al. Screening for thalassemia trait by electronic measurement of mean corpuscular volume. **N. Engl. J. Med.**, v. 288, p. 351-353, 1973.
- RAMALHO, A. S. et al. A Portaria n. 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. **Caderno Saúde Pública**, v. 19, n. 4, jul./ago. 2003.
- RAVEL, R. **Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.
- ROBBINS, S. L. et al. Doença dos eritrócitos e distúrbios hemorrágicos. In: **PATOLOGIA estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.552-557.
- TOMÉ-ALVES, R. et al. Hemoglobinas AS/Alfa talassemia – importância diagnóstica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, n. 3, 2000.
- TORRES, F. R.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Hemoglobinas humanas – hipótese malária ou efeito materno? **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 27, n. 1, jan./mar. 2005.
- VALLADA, E. P. **Manual de técnicas hematológicas**. São Paulo: Atheneu, 2002.
- VIANA-BARACIOLI, L. M. S. et al. Prevenção de hemoglobinopatias a partir do estudo em gestantes. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 23, p. 31-39, 2001.
- WAGNER, S. C. et al. Prevalência de talassemia e hemoglobinas variantes em pacientes com anemia não-ferropênica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 1, n. 27, jan./mar. 2005.
- ZAGO, M. A. Hemoglobinopatias: prevalência e variabilidade. **Rev. Paul. Med.**, v. 104, p. 300-304, 1986.
- ZAMARO, P.J.A. et al. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinas semelhantes à Hb S. **J. Bras. Patol.**, v. 38, p. 261-266, 2002.

INSTRUÇÃO PARA AUTORES

A revista *SAÚDE E PESQUISA* é um periódico de publicação quadrimestral que objetiva divulgar a produção do conhecimento relacionado às áreas biológicas e da saúde. Prioriza a publicação de artigos originais, publicando também artigos de revisão e relato de casos.

Os manuscritos apresentados à revista devem ser originais, isto é, não ter sido publicado em qualquer outro periódico no país. O procedimento adotado para aceitação definitiva será:

- Primeira Etapa: seleção dos artigos segundo critérios editoriais. O Conselho Editorial constitui a instância responsável por essa etapa.
- Segunda Etapa: parecer de Consultores ad hoc. Os pareceres comportam três possibilidades:

- a) Aceitação na íntegra;
- b) Aceitação com modificações;
- c) Recusa integral.

Em sendo aprovado nessas duas etapas, o artigo será publicado no primeiro número da revista com espaço disponível.

O periódico não tem como critério exclusivo de publicação a ordem cronológica na qual recebe os textos e sim sua aceitação nas etapas descritas acima.

O Conselho Editorial não se compromete a devolver os originais enviados.

Os direitos autorais dos artigos publicados pertencem ao periódico.

NORMAS GRÁFICAS

São adotadas, neste periódico, as normas de documentação da **Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)**.

O artigo deve ser escrito considerando um mínimo de 10 e um máximo de 20 páginas, digitados em papel A4 (tamanho 21 cm X 29,70 cm), com margem superior e esquerda de 3 cm, inferior e direita de 2 cm, paginados, parágrafo justificado com recuo de 1,5 cm na primeira linha, fonte Arial, tamanho 12, espaçamento entre linhas 1,5 cm em todo o artigo, com exceção do resumo, que deve ser formatado com espaço entre linhas simples, e das citações superiores a 3 (três) linhas, que devem obedecer as normas gráficas para citação da ABNT.

As ilustrações devem ser encaminhadas em arquivos separados, gravados em extensão *.TIF, em modo CMYK para as coloridas e modo grayscale (tons de cinza) para as P&B, com resolução de 300dpi.

A ordem dos tópicos do artigo deve ser a seguinte:

- **Título:** deve estar figurado no topo da página, em letras maiúsculas, centralizado, fonte tamanho 14 e negrito. Após o título, deixar duas linhas em branco em fonte tamanho 12;
- **Autoria:** Abaixo do título, deverá estar o nome do (s) autor(es), alinhado à direita, negrito, fonte tamanho 12, em linhas distintas. Em nota de rodapé, deve figurar a identificação do(s) autor(es), com o nome do curso/ departamento/instituição ao qual pertence(m), bem como os respectivos e-mails.

- **Resumo:** Após os nomes dos autores, deve-se escrever a palavra Resumo em fonte tamanho 12, negrito, alinhado à esquerda. Deve-se ainda deixar uma linha em branco para iniciar seu conteúdo, que deve estar em um parágrafo de no máximo 15 linhas ou 250 palavras, sem recuo na primeira linha. Deve ser usado espaçamento simples entre linhas, justificado, em fonte tamanho 12, sem citação de autoria.

- **Palavras-chave:** Após o resumo, escrever o termo Palavras-chave em fonte tamanho 12, negrito, alinhado à esquerda. Em seguida listar no mínimo 3 (três) e no máximo 5 (cinco) palavras-chave que identificam a área do artigo e sintetizam sua temática.

- **Abstract:** Em Inglês, com formatação igual a do Resumo.

- **Keywords:** Em Inglês, com formatação igual a das Palavras-chave.

- **Texto principal:** Deve ser subdividido, no mínimo, em:

- Artigo original e Relato de casos: Introdução, Material e Métodos (Metodologia), Resultados, Discussão, Conclusão e Referências.

- Artigo de Revisão: Introdução, Desenvolvimento, Considerações Finais e Referências.

O texto deve ser escrito usando fonte tamanho 12. O espaçamento entre as linhas deve ser 1,5. O alinhamento do texto deve ser justificado e a primeira linha do parágrafo deve ter recuo de 1,5 cm. Se, porventura, o trabalho utilizar termos em língua estrangeira, estes deverão ser escritos usando o modo itálico, exceto a palavra *apud*.

- **Títulos das Seções:** Devem ter numeração progressiva, conforme NBR 6024 (2003), e alinhamento à margem esquerda, sem utilizar ponto, hífen, travessão ou qualquer outro sinal após o indicativo da seção ou de seu título (NBR 6024, 2003).

Exemplo de formatação das seções/títulos:

SEÇÃO PRIMÁRIA - LETRA MAIÚSCULA e negrito
SEÇÃO SECUNDÁRIA - LETRA MAIÚSCULA e sem negrito
Seção Terciária - Em negrito e somente o início das palavras em maiúsculo.

- **Citações:** Nas citações, usar o sobrenome do autor e ano: Lopes (2005) ou (LOPES, 2005);. Para mais de dois autores, utilizar *et al.* (NBR 10520, 2002).

- **Referências:** Deverão ser organizadas em ordem alfabética, de acordo com as normas ABNT-NBR-6023, ago. 2002. Para trabalhos com até três autores, citar o nome de todos; acima de três, citar o primeiro seguido da expressão *et al.*

ARTIGOS DE PERIÓDICO

BERTOLINI, S.M.M.G.; STOCCO, F.A.; JORDÃO, M.T.
Estudo da artéria interventricular anterior de coração humano