

A 14-Year-Old Boy with Chronic Cyanosis, Mild Anemia, and Limited Physical Resistance to Stress

Berndt Zur1,* , Bernd Mayer-Hubner², Michael Ludwig¹ and Birgit Stoffel-Wagner¹

Um Garoto de 14 Anos com Cianose Crônica, Leve Anemia e Limitada Resistência Física ao Esforço

Berndt Zur1,* , Bernd Mayer-Hubner², Michael Ludwig¹ and Birgit Stoffel-Wagner¹

¹Department of Clinical Chemistry and Clinical Pharmacology, University of Bonn, Bonn, Germany;

²Medical Practice for Internal Medicine, Hausham, Germany.

* Envie correspondência para esse autor para: Department of Clinical Chemistry and Clinical Pharmacology, University Hospital Bonn, Sigmund-Freud-Str. 25, D 53127 Bonn, Germany. Fax +49-228-287-12159; e-mail berndt.zur@ukb.uni-bonn.de.

CASO

Em Abril de 1997, um então garoto de 4 anos de repente caiu doente com febre, tosse, fadiga, e fraca resistência física ao esforço. Acentuada cianose dos lábios e das bases das unhas foi notada. Durante sua permanência de 3 semanas no hospital, micoplasmose do pulmão e uma infecção por vírus sincicial respiratório foram diagnosticadas pela detecção de aglutininas de *Mycoplasma* de alto título em amostras séricas e resultados positivos de testes para a presença de vírus sincicial respiratório nas secreções nasofaríngeas. Além disso, alveolite alérgica exógena incipiente foi suspeitada por causa da presença de periquitos e calopsitas na casa do garoto e o achado de soro positividade para precipitina da IgG. A condição do garoto gradualmente melhorou com tratamento de cefuroxima e claritromicina e terapia do oxigênio. Deficiência de α 1-antitripsina e fibrose cística foram excluídas. Já que a saturação do oxigênio do paciente deixou de melhorar durante o sono e às vezes caía para bem abaixo de 90%, um exame cardiológico foi realizado, e um defeito cardíaco foi excluído. A contagem de reticulócitos e a curva do espectro de absorção da

oxihemoglobina e deoxihemoglobina estavam dentro do intervalo de referência. Resultados do hemograma estavam como se segue: leucócitos, 5500/ μ L (intervalo de referência, 5100–12 900/ μ L); hemoglobina, 11 g/dL (intervalo de referência, 10.7–13.9 g/dL); trombócitos, 319 000/ μ L (intervalo de referência, 200 000–445 000/ μ L); volume corpuscular médio, 78 fL (intervalo de referência, 74–89 fL); hemoglobina corpuscular média, 26 pg (intervalo de referência, 24.5–31 pg). Ao mesmo tempo, eletroforese da hemoglobina excluiu hemoglobinopatia. Um ano mais tarde, o garoto foi eletivamente readmitido à clínica pediátrica para avaliação da baixa, intermitente e contínua saturação do oxigênio. Alveolite alérgica exógena foi excluída após lavagem broncoalveolar; sarcoidose também foi excluída. Ligeira cianose dos lábios foi mais uma vez notada, entretanto. Oximetria do pulso mostrou saturação normal do oxigênio >93% durante o dia, mas a saturação do oxigênio repetidamente caiu para 85% durante o sono. Administração do oxigênio melhorou a saturação imediatamente para >95%. Essas flutuações na saturação do oxigênio foram confirmadas por análise gasométrica sanguínea capilar. Quando a mãe calhou de experimentar o clipe

de dedo do oxímetro de pulso em seu próprio dedo durante a permanência do garoto no hospital, baixa saturação do oxigênio foi notada nela também. Fora a hipertensão, ela não tinha nenhuma condição pré-existente. Um exame físico não revelou nem doença cardíaca e nem doença broncopulmonar. Eletroforese de hemoglobina não revelou hemoglobina anormal. A mãe relatou fraca resistência física ao esforço com dispnéia e cianose intermitente dos lábios após pequena atividade física, que tinha estado presente desde a infância. Devido a ainda não explicada causa da baixa saturação do oxigênio, a mãe foi admitida em uma unidade de pneumologia para testá-la uma vez mais para defeito cardíaco assim como síndrome de apnéia do sono. Nenhum dos diagnósticos experimentais pôde ser confirmado. Ela mostrou uma contínua

baixa saturação do oxigênio de <90%, e medições da oximetria do pulso documentaram >140 dessaturações (tão baixas quanto 71%) durante o sono. Esse achado foi eventualmente interpretado como uma medição incorreta da oximetria do pulso, entretanto, devido a má circulação acral. Tratamento psiquiátrico foi recomendado a despeito do fato de que uma análise gasométrica sanguínea capilar também tivesse revelado baixa saturação do oxigênio. Visto que a resistência física ao esforço continuava a ser muito fraca tanto na mãe quanto no filho, o clínico geral da família nos contactou após conduzir intensiva pesquisa, porque nós tínhamos anteriormente descrito uma nova variante da hemoglobina, hemoglobina Bonn, que produz medições da saturação do oxigênio falsamente baixas (1).

QUESTÕES A SEREM CONSIDERADAS

1. Que possíveis causas para cianose periférica existem uma vez que razões cardíacas e pulmonares tenham sido excluídas?
2. Que exames devem ser realizados se uma anomalia da hemoglobina for suspeitada?
3. Que limitações existem para se identificar variantes da hemoglobina?

DISCUSSÃO

ACOMPANHAMENTO DO PACIENTE

Uma saturação do oxigênio falsamente reduzida por oximetria do pulso pôde ser excluída por medição espectrofotométrica da oxihemoglobina e da desoxihemoglobina (2). Para ambos os pacientes, uma análise HPLC da hemoglobina com um instrumento de Variante II (Bio-Rad Laboratories) revelou claros picos de 32.3% e 32.8% diretamente atrás do A0 (tempo de retenção, 2.58 min; Fig. 1). Tanto para a mãe quanto para o filho, análise HPLC notou elevados valores da hemoglobina A1c (Hb A1c)3 (7.4% e 7.5%, respectivamente; intervalo de

referência não diabética, <5.7%; separador do diabetes $\geq 6.5\%$), a despeito dos resultados normais da glicose. As percentagens de Hb A1c obtidas pelo imunoensaio (Dimension Vista; Siemens) foram 5.9% para o garoto e 5.4% para a mãe (intervalo de referência não diabética, <5.7%; separador do diabetes, $\geq 6.5\%$). Eletroforese em gel de hemoglobina (Hydrasys; Sebia) foi realizada em pH 6.0 e pH 8.5. Nenhuma anormalidade foi encontrada. Eletroforese capilar da hemoglobina (Capillarys; Sebia) também não revelou nenhuma anormalidade. Uma amostra do sangue arterial analisada por co-oximetria para saturação do oxigênio mostrou

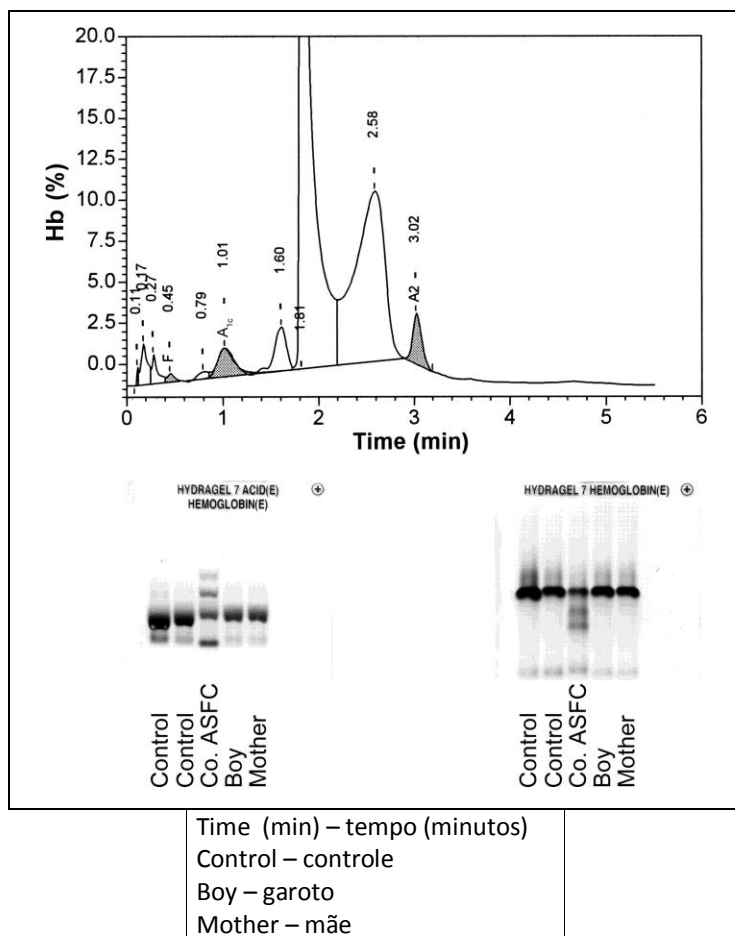
uma pressão normal do oxigênio de 94 mmHg (intervalo de referência, 70–100 mmHg) e um reduzido valor de saturação do oxigênio arterial de 84% (intervalo de referência, >96%). Valores da metahemoglobina e carboxihemoglobina

estavam normais. A pressão parcial do O₂ na qual a hemoglobina está semisaturada (P50) no sangue total foi medida com um analisador gasométrico sanguíneo e descobriu-se estar elevada [39 mmHg; normal, 26 mmHg (1)].

Fig. 1.

Cromatograma da hemoglobina Venusberg mostrando um claro pico em 2.58 min e resultados da eletroforese de hemoglobina (E) mostrando nenhuma aparente anormalidade eletroforética.

O anodo (+) é indicado no topo de cada imagem de gel da eletroforese. Co. ASFC, hemoglobinas de controle A, S, F, e C.



Visto que os resultados do HPLC sugeriam uma variante herdada da hemoglobina, amostras sanguíneas foram coletadas de membros da família em tubos contendo EDTA. DNA genômico foi isolado das amostras de sangue com o Kit

de Sangue QIAamp DNA (Qiagen). Ampliação dos exons da HBB (hemoglobina, beta) foi realizada pelo PCR (sequências de oligonucleotídeos disponíveis por pedido). Para análise mutacional, produtos do DNA amplificados do PCR fo-

ram submetidos à sequenciamento automatizado direto (373A DNA Sequencer; Applied Biosystems). Inicialmente, ambas amplificações dos pacientes foram sequenciadas, e segregação da mutação nos membros da família foi investigada sequenciando-se os respectivos produtos do PCR para exon 2. Sequenciamento do gene HBB na mãe e no filho revelou uma única transição c.255C>T (GenBank acesso no. NM_000518.4) no exon 2 do gene HBB, produzindo uma substituição p.Leu68Phe. Essa mutação não foi descrita até agora, e nós a denominamos de “hemoglobina Venusberg.” Focalização isoeletrica não foi realizada. Nenhuma anormalidade com a hemoglobina Venusberg pode ser assumida, entretanto, porque nenhuma foi notada para 2 outras hemoglobinas com mutações na mesma posição [hemoglobina Brisbane (β Leu68His) (3) e hemoglobina Mizuho (β Leu68Pro) (4)]. Mutações nessa área da cadeia β estão localizadas dentro da ligação heme, que é importante para ligação do oxigênio (5).

Anomalias da hemoglobina com baixa afinidade do oxigênio são raras; entretanto, elas podem frequentemente levar a baixa saturação do oxigênio, cianose periférica (6), anemia, e hemólise (7). Na molécula da hemoglobina, dímeros α e β são estruturalmente estabilizados na forma desoxi (estrutura T) na forma sólida via pontes salinas. Com crescente oxigenação, as pontes salinas entre as subunidades α e β são quebradas para produzir uma forma oxi predominante (estrutura R). Uma mudança nos resíduos aminoácidos pode causar um desequilíbrio entre as estruturas R e T. Essa cooperação prejudicada entre as subunidades é postulada ser a causa mais comum da afinidade modificada do oxigênio da molécula da hemoglobina. Nesse caso, a forma desoxi (estrutura T) em particular está estabilizada (8). O exato mecanismo, entretan-

to, não foi plenamente definido, contudo uma mudança no aminoácido na posição 68 da cadeia β globina também mostra uma mudança na afinidade do oxigênio da hemoglobina Brisbane/hemoglobina Great Lakes, embora produzindo uma hemoglobina com uma alta afinidade do oxigênio (3, 9). Nenhuma conclusão pode ser tirada dos resultados dos testes in vitro com relação às características das variantes da hemoglobina e a gravidade dos sintomas (8). Limitada resistência física ao esforço não tem sido relatada até agora. Nesse contexto, a constelação sintomática da hemoglobina Venusberg é distintiva.

CIANOSE E BAIXA SATURAÇÃO DO OXIGÊNIO

As causas gerais da cianose são doenças pulmonares, cardíacas, e vasculares. Outras possíveis causas incluem formação de metahemoglobina devido à medicação (nitrito, dapsona, e assim por diante), deficiência enzimática (deficiência no citocromo b5 reductase ou citocromo b5), anomalias Hb M, variantes instáveis da hemoglobina, e variantes facilmente oxidáveis. Outras causas raras incluem sulfahemoglobina (envenenamento por sulfeto de hidrogênio, sumatriptano) e, como nesse caso, variantes da hemoglobina com reduzida afinidade do oxigênio (6). Como em muitos casos de raras anomalias da hemoglobina, o diagnóstico final foi alcançado apenas depois de um prolongado período de exame físico e avaliação laboratorial. Baixa saturação do oxigênio supõe-se primeiramente ter causas cardiológicas ou pulmonares. Em adultos, síndrome da apnéia do sono é frequentemente suspeitada (1). Diagnóstico pode ser difícil, entretanto. Ocasionalmente, erros laboratoriais são assumidos, ou causas psicossomáticas são suspeitadas.

Valores de Hb A1c falsamente altos frequentemente ocorrem em pessoas com variantes da

hemoglobina, podendo levar a uma cascata de diagnósticos para excluir diabetes mellitus. Valores de Hb A1c falsamente baixos em análises HPLC também têm sido descritos para uma variante da hemoglobina com uma baixa afinidade do oxigênio (10). Por outro lado, a baixa saturação do oxigênio na mãe ou filho nesse caso poderia ser mal interpretada durante uma emergência, intra operativamente, ou em tratamento intensivo. Uma alta P50 indica uma mudança para a direita na curva de dissociação do oxigênio, isto é, uma baixa afinidade do oxigênio. Em um caso de baixa saturação do oxigênio de origem desconhecida, a possibilidade de uma variante anômala da hemoglobina com uma baixa afinidade do oxigênio deve ser levada em consideração. Em tal caso, a P50 é a mais

diagnosticamente conclusiva. Também é um critério diagnóstico para hemoglobina Venusberg. O nome “hemoglobina Venusberg” foi escolhido para marcar o lugar da primeira descoberta dessa hemoglobina, o local da University Clinics Bonn. No presente caso, eletroforese de hemoglobina foi realizada duas vezes em ambos os pacientes, que levou à exclusão errônea de uma hemoglobinopatia. Nem todas as variantes da hemoglobina produzem mudanças na carga que são detectáveis pela eletroforese de hemoglobina. Se uma hemoglobinopatia é suspeitada, vários métodos de detecção devem ser aplicados, se possível. Hemoglobina Venusberg é claramente detectável como um pico na cromatografia da hemoglobina (Fig. 1).

PONTOS PARA SEREM LEMBRADOS

- Cianose periférica pode ser causada por doenças pulmonares, cardíacas e vasculares, deficiência de enzima, metahemoglobinemia, sulfahemoglobinemia, e anomalias da hemoglobina.
- Algumas anomalias da hemoglobina não são detectadas por eletroforese de hemoglobina. Portanto, se uma anomalia da hemoglobina for suspeitada, análise genética deve ser realizada além de cromatografia da hemoglobina.
- Sintomas da hemoglobina Venusberg incluem quedas intermitentes na saturação do oxigênio, especialmente durante o sono, ligeira cianose intermitente dos lábios e da base das unhas, limitada resistência física ao esforço, valores Hb A1c falsamente altos nas análises HPLC, eletroforese de hemoglobina normal e achados de eletroforese capilar, mas um claro pico de 32% na cromatografia da hemoglobina. As diferentes modalidades de análise da hemoglobina, eletroforese, e HPLC possuem suas próprias vantagens e desvantagens específicas. Sequenciamento do gene HBB revelou uma única transição c.255C>T no exon 2 do gene HBB, produzindo uma substituição p.Leu68Phe.

Agradecimentos

Pela excelente ajuda técnica, nossos agradecimentos vão para M. Schmidt.

Notas de Rodapé

³Abreviações não padronizadas:

Hb A1c, hemoglobina A1c; P50, pressão parcial do O₂ na qual hemoglobina está semi-saturada.

Contribuições dos Autores: Todos os autores confirmaram que eles contribuíram para o conteúdo intelectual desse paper e satisfizeram os 3 seguintes requisitos: (a) contribuições significantes para a concepção e design, aquisição de dados, ou análise e interpretação dos dados; (b) rascunhando ou revisando o artigo para conteúdo intelectual; e (c) aprovação final do artigo publicado.

Revelações dos Autores de Potenciais Conflitos de Interesse: Nenhum autor declarou qualquer potencial conflito de interesse.

Recebido para publicação em 15 de Novembro de 2010.

Aceito para publicação em 28 de Março de 2011.

© 2012 The American Association for Clinical Chemistry

Referências

1. Zur B, Hornung A, Breuer B, Doll U, Bernhardt C, Ludwig M, Stoffel-Wagner B. A novel hemoglobin, Bonn, causes falsely decreased oxygen saturation measurements in pulse oximetry. *Clin Chem* 2008;54:594–6.
2. Verhovsek M, Henderson MPA, Cox G, Luo HY, Steinberg MH, Chui DHK. Unexpectedly low pulse oximetry measurements associated with variant hemoglobin: a systematic review. *Am J Hematol* 2010;85:882–5.
3. Brennan SO, Wells RM, Smith H, Carrell RW. Hemoglobin Brisbane: beta68 Leu replaced by His. A new high oxygen affinity variant. *Hemoglobin* 1981;5:325–35.
4. Ohba Y, Miyaji T, Matsuoka M, Sugiyama K, Suzuki T, Sugiura T. Hemoglobin Mizuho or beta 68 (E 12) leucine leads to proline, a new unstable variant associated with severe hemolytic anemia. *Hemoglobin* 1977;1:467–77.
5. Rosa J, Labie D, Wajcman H, Boigne JM, Carbannes R, Bierme R, Ruffie J. Haemoglobin I Toulouse: β -66 (E 10) Lys→Glu: a new abnormal haemoglobin with a mutation localized on the E 10 prophyrin surrounding zone. *Nature* 1996;223:190–6. 6. Morita K, Fukuzawa J, Onodera S, Kawamura Y, Sasaki N, Fujisawa K, et al. Hemoglobin Kansas found in a patient with polycythemia. *Ann Hematol* 1992;65:229–31.
7. Huehns ER, Hecht F, Yoshida A, Stamatoyannopoulos G, Hartmann J, Motulsky AG. Hemoglobin-Seattle (α 2A β 276 Glu): an unstable hemoglobin causing hemolytic anemia. *Blood* 1970;36:209–18.
8. Kleihauer E. Anomale Hämoglobine und Thalassämiesyndrome: Grundlagen und Klinik. Landsberg, Germany: Ecomed Verlagsgesellschaft; 1996. p 180–204. 9. Rahbar S, Winkler K, Louis J, Rea C, Blume K, Beutler E. Hemoglobin Great Lakes (beta 68 [E12] leucine replaced by histidine): a new high-affinity hemoglobin. *Blood* 1981;58:813–7.
10. Friess U, Beck A, Kohne E, Lehmann R, Koch S, Haring HU, et al. Novel hemoglobin variant [β 66(E10) Lys→Asn], with decreased oxygen affinity, causes falsely low hemoglobin A1c values by HPLC. *Clin Chem* 2003;49:1412–3.

Comentário

Mary Frances McMullin*

Department of Haematology, Belfast City Hospital, Queen's University Belfast, Belfast, Northern Ireland.

* Envie correspondência para o autor para: Department of Haematology, 'C' Floor, Belfast City Hospital, Queen's University Belfast, Lisburn Rd., Belfast BT9 7AB, N. Ireland. Fax +44-28-90263870; e-mail m.mcmullin@qub.ac.uk.

Esse fascinante e cuidadosamente elaborado estudo do caso descreve um garoto que originalmente apresentou cianose com a idade de 4 anos. Ele e sua mãe foram descobertos ter uma hemoglobina de baixa afinidade recentemente descrita, denominada "hemoglobina Venusberg." Digno de nota são as extensivas investigações realizadas em ambos os indivíduos antes que o diagnóstico fosse obtido, o fato de que essa variante foi detectada não por eletroforese de hemoglobina e sim pela presença de uma anormalidade na cromatografia da hemoglobina, e as repetidas baixas saturações do oxigênio reveladas por oximetria do pulso. Ambos indivíduos foram relatados como tendo "limitada resistência física ao esforço," que não foi relatado antes na literatura com variantes da hemoglobina de baixa afinidade, e não está claro porque tal variante deve levar à limitada tolerância ao exercício.

Oxigênio é transportado no sangue ligado à hemoglobina, e cada tipo de hemoglobina tem uma certa capacidade de reter oxigênio. Nos

pulmões, a pressão parcial do oxigênio é alta, e o oxigênio se liga à hemoglobina, ao passo que nos tecidos a pressão parcial é mais baixa, e o oxigênio é liberado quando necessário. Essa relação entre a pressão parcial do oxigênio e a saturação do oxigênio da hemoglobina é descrita na curva de dissociação do oxigênio. Com hemoglobinas normais sob condições normais, hemoglobina está 50% saturada em uma pressão parcial do oxigênio de 26.6 mmHg (a P50). A curva é mudada para a direita para dar uma P50 mais alta. Isso significa que uma pressão parcial maior é necessária para manter 50% de saturação, e existe reduzida afinidade do oxigênio. Uma hemoglobina tal como hemoglobina Venusberg possui uma alteração que leva a uma afinidade mais baixa do oxigênio e desse modo a uma curva de dissociação do oxigênio virada para a direita.

É importante considerar essas variantes da hemoglobina em tal caso para explicar a cianose e para tentar evitar investigação desnecessária. Nenhum tratamento é necessário.

Notas de Rodapé

Contribuições dos Autores: Todos os autores confirmaram que eles contribuíram para o conteúdo intelectual desse paper e satisfizeram os 3 seguintes requisitos: (a) contribuições significantes para a concepção e design, aquisição de dados, ou análise e interpretação dos dados; (b) rascunhando ou revisando o artigo para conteúdo intelectual; e (c) aprovação final do artigo publicado.

Revelações dos Autores de Potenciais Conflitos de Interesse: Nenhum autor declarou qualquer potencial conflito de interesse.

Recebido para publicação em 27 de Abril de 2011.

Aceito para publicação em 3 de Maio de 2011.

© 2012 The American Association for Clinical Chemistry

Comentário

Archana M. Agarwal* and Roberto Nussenzveig

Department of Pathology, University of Utah Health Sciences Center, Salt Lake City, UT.

* Envie correspondência para esse autor para: Department of Pathology, 500 Chipeta Way, Mail Stop 115-G04, Salt Lake City, UT. E-mail archana.agarwal@hsc.utah.edu.

Zur e colegas relataram a identificação de uma nova mutação da β -globina que produziu uma hemoglobina com reduzida afinidade do oxigênio num garoto de 4 anos com fraca resistência física ao esforço. Mutações tanto nos genes da α - e β -globina que produzem variantes de baixa afinidade têm sido relatadas, embora variantes da hemoglobina de baixa afinidade sejam raras se comparadas com variantes de alta afinidade (1, 2). Leve anemia com reduzida saturação do oxigênio e reduzida eritropoietina é geralmente notada, e cianose também pode estar presente em alguns casos. Homozigotidade para variantes de baixa afinidade não tem sido relatada, provavelmente por causa da letalidade embriônica. Detecção da hemoglobina do oxigênio de baixa afinidade deve estar no diagnóstico diferencial dos pacientes com cianose. Se uma hemoglobina de baixa afinidade for suspeitada depois que as causas pulmonares e cardiovasculares comuns tiverem sido excluídas, teste diagnóstico deve fazer uso de HPLC e determinação da curva total da dissociação do oxigênio [pressão parcial do O₂ na qual a hemoglobina está semisaturada (P50) e o coeficiente Hill] por hemoximetria. Saturação do oxigênio e P50 cal-

culadas do pH e da pressão do oxigênio (Po₂) devem ser usadas com cautela, devido a suposições usadas com esses cálculos com relação às concentrações normais de 2,3-difosfoglicerato e de nenhuma hemoglobina anormal. Diagnóstico definitivo, entretanto, dependerá do sequenciamento do gene da globina (α e β). Dois distintos modelos têm sido propostos para descrever o mecanismo para as variantes da hemoglobina de baixa afinidade (β -L68F) e de alta afinidade (β -L68H) discutidas no relatório do caso por Zur et al. Nós supomos que a cadeia lateral maior e mais volumosa da fenilalanina na variante β -L68F está provavelmente associada com obstrução estérica no estado relaxado (R), levando à estabilização do estado tenso (T) e portanto a uma hemoglobina de baixa afinidade. Em contraste, a substituição β -L68H coloca histidina 68 dentro do limite de ligação H do triptofano 15, que agora estabiliza o estado R e portanto produz uma variante de alta afinidade. Tratamento não é necessário para esses pacientes; entretanto, identificação da variante da hemoglobina é importante para evitar investigação desnecessária e aliviar as preocupações do paciente e da família.

Notas de Rodapé

Contribuições dos Autores: Todos os autores confirmaram que eles contribuíram para o conteúdo intelectual desse paper e satisfizeram os 3 seguintes requisitos: (a) contribuições significantes para a concepção e design, aquisição de dados, ou análise e interpretação dos dados; (b) rascunhando ou revisando o artigo para conteúdo intelectual; e (c) aprovação final do artigo publicado.

Revelações dos Autores de Potenciais Conflitos de Interesse: Nenhum autor declarou qualquer potencial conflito de interesse.

Recebido para publicação em 26 de Setembro de 2011.

Aceito para publicação em 3 de Outubro de 2011.

© 2012 The American Association for Clinical Chemistry

Referências

1. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ, Agarwal N, Nagel RL, Prchal JT. Dyshemoglobinemias. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ, eds. Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management. 2nd ed. New York: Cambridge University Press; 2009. p 607–22.
2. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ, Steinberg MH, Nagel RL. Unstable hemoglobins, hemoglobins with altered oxygen affinity, hemoglobin M and other variants of clinical and biological interest. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ, eds. Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management. 2nd ed. New York: Cambridge University Press; 2009. p 589–606.

“This article has been translated with the permission of AACC. AACC is not responsible for the accuracy of the translation. The views presented are those of the authors and not necessarily those of the AACC or the Journal. Reprinted from Clin Chem, 2012; 58: 2 332-335, by permission of AACC. Original copyright © 2011 American Association for Clinical Chemistry, Inc. When citing this article, please refer to the original English publication source in the journal, Clinical Chemistry.”

“Este artigo foi traduzido com a permissão da AACC. AACC não é responsável pela acurácia da tradução. Os pontos de vista apresentados são aqueles dos autores e não necessariamente os da AACC ou do Journal. Reimpresso da ClinChem, 2012; 58: 2 332-335, por permissão da AACC. Cópia original © 2011 American Association for Clinical Chemistry, Inc. Quando citar este artigo, por favor refira-se à fonte de publicação original em inglês na revista, Clinical Chemistry.”