

NILCÉIA MARIA VIVIANI

**Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos
associados ao estudo molecular para caracterização da
 β -talassemia heterozigótica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Nairo Massakazu Sumita

**São Paulo
2008**

AGRADECIMENTOS

Á Deus.

A minha família querida, *Ana Carolina V. Pagenotto* e *Isabella V. Silva* minhas filhas, *Aparecida Silva* minha mãe e *Luiz Mário Alves da Silva* meu esposo pelo carinho, apoio, incentivo, dedicação e compreensão durante todo o tempo de desenvolvimento dessa dissertação.

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Nairo Massakazu Sumita* pela orientação, paciência, oportunidade e confiança em mim depositada.

A *Prof. Dra. Maria Elizabete Mendes*, Chefe do Laboratório de Bioquímica Clínica da Divisão de Laboratório Central (LIM 03) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo incentivo, apoio e amizade.

Ao *Prof. Dr. Marcelo Burattini*, Diretor de Divisão de Laboratório Central - LIM 03 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com admiração pelo seu trabalho administrativo.

Ao *Prof. Dr. José Eduardo Levi* Chefe da Biologia Molecular do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, pela orientação, auxílio e colaboração ao permitir a realização dos testes de biologia molecular.

A *Prof. Dra. Dulcinéia Albuquerque Martins*, bióloga do Laboratório de Hemoglobina e Genoma - Hemocentro II - UNICAMP pela atenção, paciência e valiosa colaboração na realização e análise dos dados de biologia molecular.

A *Ana Carolina Mamana e Adriana Tateno* pela paciência, apoio, auxílio no trabalho de biologia molecular e momentos de discussão científica.

Ao amigo *Paulo Roberto Santos Pereira*, que despertou meu interesse pela pesquisa. Meus agradecimentos pelo incentivo e motivação para iniciar esse desafio.

Aos colegas do Serviço de Bioquímica Clínica da Divisão de Laboratório Central do Hospital das clínicas da FMUSP, pelo apoio e amizade.

A amiga *Francisca, Neide Abe e Phâmela* da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP, pela atenção e ajuda em todas as horas.

Ao Dr. *Wagner Milanello* chefe do laboratório do Hospital Darcy Vargas, pela colaboração e gentileza.

As funcionárias do setor de pós-graduação da Fisiopatologia Experimental do Hospital das Clínicas em especial a secretária *Sonia*, pela sua paciência, dedicação, atenção e gentileza.

Aos funcionários da Biblioteca Central da Faculdade de Medicina da USP, pela dedicação com que realizam suas funções, obrigado pelo apoio e gentileza.

Aos amigos *Ana Laura, Roberto, Meire, Lia, Mônica, Rosimar*, pelas palavras de incentivo e amizade.

Ao colega *Marcos André Cavalcante Bezerra* biomédico do Laboratório de Hemoglobina e Genoma - Hemocentro II - UNICAMP pela atenção e colaboração.

As Empresas *Ciencor Scientific, Invitrogen* e *Millipore* pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors*.
(*Vancouver*)

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e documentação. *Guia de apresentação de dissertações, tese e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena.

São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

LISTA DE ABREVIATURAS

A – Nucleotídeo Adenina

CD – *Códon*

C – Nucleotídeo Citosina

G – Nucleotídeo Guanina

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

Hb – Hemoglobina

HbA – Hemoglobina Normal do Adulto com maior porcentagem

HbA₂ - Hemoglobina Normal do Adulto com menor porcentagem

HbF – Hemoglobina Fetal

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

HPLC – Cromatografia Líquida de alta performance

IVS – *Intervining Sequence*

Kb - Kilobases

LCR – Região Controladora de Lócus

Pb – pares de bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PHHF – Persistência da hemoglobina Fetal

RDW – *Red Cell Distribution Width*

RNA – Ácido Ribonucléico

RO – Resistência Osmótica

VCM – Volume Corpuscular Médio

GLOSSÁRIO

ANISOCITOSE – Variação de tamanho das hemácias

CODON – grupo de três nucleotídeos do DNA que codifica um aminoácido

CROSSING-OVER – troca de pedaços entre cromossomos homólogos durante a meiose

DELEÇÃO – perda de pedaços dos cromossomos

EXON – seqüência codificadora do gene

FENÓTIPO – é a expressão do genótipo junto com a influência do meio ambiente

GENE POLIMORFO – que apresenta freqüência entre 1 a 99%

GENÓTIPO – conjunto de genes do indivíduo

HETEROGENEIDADE GENÉTICA – existência de dois ou mais genes diferentes que levam a fenótipos idênticos

HETEROZIGOTOS – genes diferentes para a mesma característica

HOMOZIGOTOS - genes iguais para a mesma característica

INTRON – seqüência intercalante não codificadora do gene

LOCUS GÊNICO – local no cromossomo que é ocupado pelo gene

MUTAÇÕES – alteração de um ou mais genes

MUTAÇÃO NONSENSE – Mutação “sem sentido”, incapaz de gerar a síntese de proteínas

PRIMERS – Fita com seqüência específica de nucleotídeos para gerar produto de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

RDW – Índice que indica anisocitose das hemácias, representando a percentagem de variação dos volumes obtidos

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro

SPLICING – emenda do RNA_m com excisão dos introns

Taq polimerase – enzima usada na reação de PCR

Thermus aquaticus – Bactéria da qual se isola a *Taq polimerase*

TRADUÇÃO – leitura da mensagem contida no RNA_m realizada pelo ribossomo e pelo RNA transportador

TRANSCRIÇÃO – processo pelo qual o RNA_m é sintetizado com base em seqüência de DNA (gene)

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Representação da <i>LCR</i> e os genes estruturais da β -globina dentro do cromossomo 11. Os genes são arranjados em ordem linear, refletindo sua expressão durante as diferentes fases do desenvolvimento humano ⁽⁴⁾ | 4 |
| Figura 2 - Representação esquemática da estrutura tridimensional de uma cadeia globínica, composto por oito segmentos helicoidais e seis não helicoidais ⁽¹⁰⁾ | 9 |
| Figura 3 - Distribuição geográfica, na região do mediterrâneo, das principais mutações para β -talassemia. Adaptado de Cao, 1997 ⁽⁵⁰⁾ | 26 |
| Figura 4 - Eritrócitos apresentando palidez central e acentuada microcitose. Índice hematimétrico: VCM de 64,2 fL e HCM de 20,2 μ g..... | 53 |
| Figura 5 -Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo 0,05 mg/mL. Controle negativo BR, controle positivo C+. | 63 |
| Figura 6 -Seqüenciamento mutação <i>códon</i> 39 (C→T) | 66 |
| Figura 7 -Seqüenciamento mutação IVS-I-110 (G→A)..... | 66 |
| Figura 8 -Seqüenciamento mutação <i>códon</i> 6 (G→T). | 66 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 -Distribuição dos pontos de mutações mais comuns de β -talassemia nas populações do mediterrâneo e afro-americanos. Modificado de OLD, 2003 ⁽⁴⁶⁾ ... | 25 |
| Tabela 2 -Comparação da distribuição (%) das mutações para β -talassemia entre o Nordeste (Recife) e o Sudeste (Ribeirão Preto e Campinas) do Brasil Adaptado de Araújo, 2003 ⁽⁵³⁾ | 28 |
| Tabela 3 -Valores de VCM, HCM e perfil de hemoglobina por eletroforese no indivíduo normal, na β -talassemia e na deficiência de ferro. Adaptado de Old, 2003 ⁽⁴⁶⁾ | 30 |
| Tabela 4 -Valores sugeridos pelo fabricante do método de HPLC (variant™ - bio-rad laboratories, inc., Califórnia, USA) para triagem da β -talassemia e persistência da hemoglobina fetal através dos níveis de HbA ₂ e HbF ⁽⁷⁹⁾ | 43 |
| Tabela 5 -Distribuição da origem étnica da população com características hematológicas para β -thalassemia. | 52 |
| Tabela 6 -Valores mínimos e máximos, média, desvio padrão e valores de referência dos parâmetros bioquímicos e hematológicos..... | 55 |
| Tabela 7 -Resultados de HbA ₂ obtidos pelo método do HPLC e eletroforese em meio alcalino, em 40 pacientes portadores de mutação para β -talassemia. | 62 |
| Tabela 8 -Frequência e distribuição das mutações observadas para β -talassemia | 64 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1: Distribuição dos valores de ferro sérico nos pacientes com mutação genética para β -talassemia. | 56 |
| Gráfico 2: Distribuição dos valores de ferritina sérica nos pacientes com mutação genética para β -talassemia. | 56 |
| Gráfico 3: Distribuição dos valores de hemoglobina fetal nos pacientes com mutação genética para β -talassemia..... | 57 |
| Gráfico 4: Distribuição dos percentuais de hemoglobina A ₂ por HPLC e eletroforese em gel de agarose, pH alcalino, nos pacientes com mutação para β -talassemia. | 57 |
| Gráfico 5: Distribuição dos valores de eritrócitos nos pacientes com mutação genética para β -talassemia. | 58 |
| Gráfico 6: Distribuição dos valores de hemoglobina nos pacientes com mutação genética para β -talassemia. | 58 |
| Gráfico 7: Distribuição dos valores de hematócrito nos pacientes com mutação genética para β -talassemia. | 59 |
| Gráfico 8: Distribuição dos valores de VCM nos pacientes com mutação genética para β -talassemia. | 59 |
| Gráfico 9: Distribuição dos valores de HCM nos pacientes com mutação genética para β -talassemia. | 60 |
| Gráfico 10: Distribuição dos valores de CHCM nos pacientes com mutação genética para β -talassemia. | 60 |
| Gráfico 11: Distribuição dos valores de RDW-CV nos pacientes com mutação genética para β -talassemia. | 61 |
| Gráfico 12: Distribuição dos valores de RDW-SD nos pacientes com mutação genética para β -talassemia. | 61 |

RESUMO

Viviani NM. *Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos associados ao estudo molecular para caracterização da β -talassemia heterozigótica* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 92p.

Talassemias são as mais comuns desordens monogenéticas em humanos; são caracterizadas pela presença de anemia microcítica e hipocrômicas que resultam da redução ou ausência na síntese de uma ou mais cadeias globínicas. No Brasil a β -talassemia tem importante significado clínico e sua ocorrência pode ser explicada como consequência da grande mistura étnica. A β -talassemia é extremamente heterogênea e mais de 200 mutações têm sido descritas causando diferentes graus de anemia. Essas mutações são regionalmente específicas e cada país possui seu grupo de alterações característico. No estado homocigoto são classificadas clinicamente como major e no estado heterocigoto como intermédia e minor. Os pacientes com talassemia intermédia podem não apresentar sintomas clínicos, mas constatam-se características laboratoriais específicas. A avaliação dos índices hematológicos, dosagens dos parâmetros bioquímicos e dos valores das hemoglobinas fetal e HbA₂ em combinação com o entendimento das possíveis interações gênicas são os procedimentos recomendados para o diagnóstico laboratorial. O objetivo deste estudo foi determinar a presença de mutações em pacientes que utilizam a Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo (DLC-HC-FMUSP) e que apresentavam perfil laboratorial sugestivo para β -talassemia. Estudou-se a região do gene da β globina em onde estão descritas as mutações mais frequentes para nosso meio através da técnica de PCR, e posterior seqüenciamento para identificação das mutações. As mutações observadas na população avaliada (N=40), em ordem crescente de frequência foram: *Codon 39* (C→T), *IVS-I-110* (G→A), *IVS-I-1*(G→A), *IVS-I-5* (G→C), *IVS-I-6* (T→C), *IVS-I-Exon-II* (G→A), *Exon-II-IVS-II* (G→A), *Stop Cd 6* (G→T), *Stop Cd15* (G→A), *Del C Cd 44* e *5'UTR+20*. Os primeiros quatro genótipos representaram 82,5% das mutações observadas neste trabalho. O uso combinado dos índices hematimétricos, parâmetros bioquímicos e avaliação das características morfológicas das hemácias demonstraram eficiência no rastreamento de pacientes portadores de β -talassemia, assintomáticos. A técnica do PCR e posterior processo de seqüenciamento demonstraram elevada eficiência na determinação das alterações moleculares no grupo de pacientes avaliados.

Descritores: talassemia, talassemia-beta, Técnicas e procedimentos de laboratório, mutação e Brasil.

SUMMARY

Viviani NM. *Evaluation of biochemical and hematological parameters associated with molecular study for characterization of the β -thalassemia heterozygous* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 92p.

Thalassemias are the most common monogenic disorders in humans; are characterized by hypochromic and microcytic anemia arising from the reduction or absence in the synthesis of one or more chains globínicas. In Brazil, β -thalassemia has important clinical significance and its occurrence can be explained as a result of the large ethnic mix. The β -thalassemia is extremely heterogeneous and more than 200 mutations have been described causing varying degrees of anemia, these mutations are regionally specific and each country has its characteristic group of amendments. In the homozygous state are clinically classified as major and the heterozygous state as intermediate and minor. Patients with thalassemia can not present interim clinical symptoms, but have characteristics specific laboratory. The evaluation of hematologic indices, strengths and biochemical parameters of fetal hemoglobin and HbA₂ values in combination with an understanding of possible interactions genes, are the recommended procedures for laboratory diagnosis. The purpose of this study was to determine the presence of mutations in patients who use the Division of Central Laboratory of the Hospital of the Faculty of Medicine of the University Sao Paulo (DLC-HC-FMUSP) who presented suggestive profile laboratory for β -thalassemia. It was studied the region of the gene of β globin where they are frequently described the changes to our region through the PCR technique, and subsequent sequencing to identify the mutations. Of the 40 patients evaluated were found the following changes: *Codon 39 (C→T)*, *IVS-I-110 (G→A)*, *IVS-I-1 (G→A)*, *IVS-I-5 (G→C)*, *IVS-I-6 (T→C)*, *IVS-I-Exon-II (G→A)*, *Exon-II-IVS-II (G→A)*, *Stop Cd 6 (G→T)*, *Stop Cd15 (G →A)*, *Del Cd 44* and *5'UTR+20*. The first four genotypes accounted for 82.5% of mutations observed in this study. The combined use of hematologic indices, biochemical parameters and evaluation of morphological characteristics of red blood cells demonstrated efficiency in the tracking of patients with β -thalassemia, asymptomatic. The technique of PCR and subsequent process of sequencing demonstrated high efficiency in determining the molecular changes in the group of patients evaluated.

Descriptors: thalassemia, beta-thalassemia, Techniques and procedures, mutation and Brazil.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Glossário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

Resumo

Summary

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 ONTOGÊNESE E ESTRUTURA MOLECULAR DA HEMOGLOBINA | 2 |
| 1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DA HEMOGLOBINA..... | 10 |
| 1.3 DEFINIÇÃO E HISTÓRICO DA BETA-TALASSEMIA..... | 12 |
| 1.4 ORIGEM GENÉTICA DA BETA TALASSEMIA..... | 16 |
| 1.4.1 Mutações Transcricionais | 20 |
| 1.4.2 Mutações que afetam o RNA <i>Splicing</i> | 21 |
| 1.4.3 Mutações que alteram a tradução do RNA mensageiro..... | 23 |
| 1.5 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA β -TALASSEMIA | 25 |
| 1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA β -TALASSEMIA | 28 |
| 2. OBJETIVO..... | 32 |
| 2.1 OBJETIVOS GERAIS | 33 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 33 |
| 3. MÉTODOS | 34 |
| 3.1 Coleta e preparo das amostras..... | 36 |
| 3.2 Prova de Resistência Osmótica..... | 37 |
| 3.2.1 Procedimento:..... | 37 |
| 3.2.2 Interpretação:..... | 37 |
| 3.3 Eletroforese de hemoglobina em meio alcalino: | 38 |
| 3.3.1 Reagentes Utilizados:..... | 38 |
| 3.3.2 Procedimento:..... | 39 |
| 3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC):..... | 40 |
| 3.4.1 Reagentes Utilizados:..... | 41 |
| 3.4.2 Procedimento:..... | 42 |
| 3.4.3 Interpretação:..... | 42 |
| 3.5 Dosagem de ferro e ferritina no soro | 43 |
| 3.5.1 Procedimento:..... | 44 |
| 3.6 Hemograma..... | 44 |
| 3.6.1 Esfregaço Sanguíneo | 44 |
| 3.7 SISTEMA DE GESTÃO DA QUALIDADE, ACREDITAÇÃO LABORATORIAL E ENSAIOS DE PROFICIÊNCIA na DLC - HC-FMUSP..... | 45 |
| 3.8 Técnica molecular..... | 46 |
| 3.9 Testes Estatísticos..... | 49 |
| 4. RESULTADOS | 51 |

| | |
|-----------------------------------|----|
| 5 DISCUSSÃO..... | 67 |
| 6. CONCLUSÕES | 76 |
| 7. ANEXOS..... | 78 |
| 8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA | 82 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 ONTOGÊNESE E ESTRUTURA MOLECULAR DA HEMOGLOBINA

Hemoglobinas são moléculas presentes no interior dos eritrócitos, cuja principal função é transportar oxigênio dos pulmões para os tecidos e gás carbônico no sentido inverso. São polipeptídios tetrâmeros, globulares, e consistem em dois pares de cadeias globínicas unidas com quatro grupos heme na cavidade central. Os grupos heme, que contêm ferro na forma ferrosa (Fe^{++}) são responsáveis pela cor vermelha das hemoglobinas e estão escondidos entre as cadeias globínicas, protegidos contra oxidação ⁽¹⁾. As diferentes combinações entre as cadeias globínicas alfa, beta, gama, delta, épsilon e zeta determinam os seis tipos de hemoglobinas humanas produzidas nas fases do desenvolvimento humano caracterizadas como embrionárias (Gower1, Gower2, Portland), fetal (HbF) e pós-nascimento (HbA e HbA₂). A hemoglobina A é o tipo predominante entre as hemoglobinas normais do indivíduo adulto e é composta por dímeros de cadeias alfa e beta, e perfazem 96% a 98% das hemoglobinas. A hemoglobina A₂ é composta por dímeros de cadeias alfa e delta e estão entre 1% a 3%, enquanto a hemoglobina fetal é composta por dímeros de cadeias alfa e gama, e que representam menos de 1% no indivíduo adulto normal ⁽²⁾. A cadeia α é composta de 141 aminoácidos, enquanto a cadeia β possui 146, com grande homologia entre as duas cadeias (64 aminoácidos estão em posições idênticas). A gênese das cadeias globínicas é regulada por grupamentos “*clusters*” de genes nos cromossomos 11 e 16, na ordem cronológica em que são expressos (sentido 5'→3') nos períodos embrionário, fetal e adulto, quando diferentes grupos de

genes são ativados ou suprimidos e diferentes cadeias globínicas são sintetizadas independentemente. No braço curto do cromossomo 16, em um segmento de DNA de 35kb, localizam-se o gene zeta (ζ), que codifica a cadeia ζ globínicas, dois pseudogenes, ($\psi\zeta$) e ($\psi\alpha 1$), e os genes alfa 1 ($\alpha 1$) e alfa 2 ($\alpha 2$), que, no ser humano, estão duplicados, devendo-se este fato provavelmente à duplicação gênica no decorrer do processo evolutivo. Estes genes duplos são responsáveis pela codificação das cadeias globínicas alfa, que possui um ritmo normal de síntese bastante elevado, uma vez que ela entra na composição de quase todas as hemoglobinas. No braço curto do cromossomo 11 localiza-se o complexo dos genes beta, com uma extensão superior a 60kb, onde se observam no sentido 5' \rightarrow 3', os genes épsilon- ϵ , gama glicina-G γ , gama alanina-A γ , um pseudogene ($\psi\beta 1$) e os genes delta- δ e beta- β . O " *β -locus control region*" (*β -LCR*) é uma região controladora localizada acima dos genes estruturais, apresenta cinco sítios sensíveis à digestão da DNase I, designadas HS 1-5, distribuídos entre 6 e 20 Kb à 5' do gene ϵ . A *LCR* é exclusiva das famílias dos genes da β -globina e tem um papel fundamental na expressão deste gene, mantendo a cromatina aberta e agindo como um acentuador poderoso da transcrição do gene, na sua ausência o nível de expressão do gene é baixo ^(3, 4).

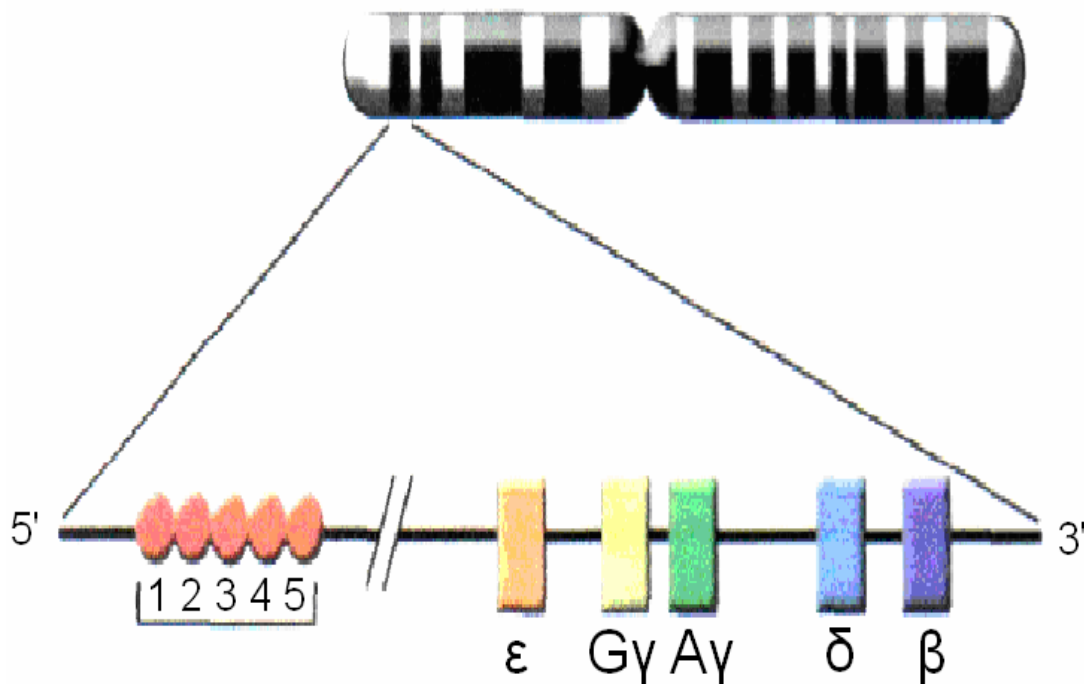


Figura 1 - Representação da *LCR* e os genes estruturais da β -globina dentro do cromossomo 11. Os genes são arranjados em ordem linear, refletindo sua expressão durante as diferentes fases do desenvolvimento humano ⁽⁴⁾.

A formação da hemoglobina começa no estágio precursor mais incipiente da célula eritróide em desenvolvimento e se completa quando o reticulócito anucleado amadurece como eritrócito. Não se produz nenhuma hemoglobina adicional durante o período de sobrevivência eritrocitária de 120 dias na circulação sanguínea periférica. A biossíntese da molécula de hemoglobina obedece a uma série complexa de eventos bioquímicos distintos, mas delicadamente coordenados, tão bem regulados que as partes componentes funcionam como uma linha de montagem, sem déficits ou excessos significativos, para constituir a molécula completa ⁽⁵⁾.

Cada uma das cadeias globínicas são sintetizadas simultaneamente em quantidades iguais e mantidas em equilíbrio ⁽⁶⁾.

As informações para a síntese da molécula de hemoglobina estão localizadas no DNA, que após o processo de transcrição produz o RNA mensageiro precursor (pré-RNA_m). O produto da transcrição inicial do DNA, o RNA mensageiro nuclear heterogêneo contém seqüências que correspondem ao gene inteiro, posteriormente, essas seqüências são cortadas e eliminadas por um processo complexo denominado “*splicing*”. A terminação 3’ ou 3’-UTR sofre a adição de aproximadamente 150 adeninas, ou cauda poli-A. A adição da cauda poli-A parece ser importante para o transporte do RNA_m até o citoplasma e subsequente estabilidade da molécula. No citoplasma ocorrem no final de cada molécula de RNA, na terminação 5’ ou 5’-UTR, a adição de uma guanina e os próximos 2 nucleotídeos são então metilados. Essas terminações 5’ modificadas são chamadas tamponadas (“*capping*”) e metiladas elas têm se mostrado vitais para a iniciação da tradução.

Uma vez que o RNA_m foi processado e transportado para o citoplasma, o primeiro passo para a tradução requer uma ligação do RNA_m a 2 subunidades do ribossomo. A iniciação ocorre na terminação 5’ do RNA_m que corresponde a terminação NH₂, da cadeia de globina. A síntese protéica ocorre em direção a terminação COOH. Quatro a seis cadeias de comprimento variado sofrem traduções no mesmo RNA_m simultaneamente. Quando essas cadeias estão anexadas ao comprimento total, a síntese do poli peptídeo é interrompida e a cadeia fica livre dos ribossomos e dos seus RNA_m. A cadeia de proteína assume suas estruturas secundárias e terciárias de acordo com as interações resultantes de suas seqüências de aminoácidos. Seguindo, o grupo heme é ligado e, em

combinação com outras subunidades de poli peptídeos, a molécula de hemoglobina quaternária é formada.

A estabilidade da molécula de hemoglobina é dependente do arranjo estrutural que ocorre entre as globinas, este arranjo é importante, pois possui interações com efeitos de cooperação entre as subunidades da molécula que desaparecem quando há quebra da molécula em dímeros ou subunidades livres.

Quaisquer perturbações nessas etapas resultam em desequilíbrio na síntese das globinas e conseqüentemente um amplo espectro de heterogeneidade fenotípica para talassemias ou hemoglobinopatias ⁽¹⁾.

No período embrionário, os genes ativos presentes nos eritroblastos, localizados no saco vitelino, promovem a produção da cadeia zeta (ζ), que, combinada à cadeia épsilon (ϵ), forma a hemoglobina Gower-1 ($\zeta\epsilon_2$); esta mesma cadeia zeta, combinada com a cadeia gama (γ), forma a hemoglobina Portland ($\zeta\gamma_2$); quando ocorre a produção das cadeias alfa (α), estas se combinam com a cadeia épsilon e formam a hemoglobina Gower-2 ($\alpha\epsilon_2$).

A produção das hemoglobinas embrionárias ocorre por um período de até três meses do início da evolução gestacional. Por grande parte da vida intra-uterina predomina a produção da hemoglobina fetal (HbF), devido a produção das cadeias alfa e gama e à sua combinação ($\alpha\gamma_2$), decaindo logo após os primeiros seis meses de vida extra-uterina. A produção das cadeias delta (δ) tem seu início por volta da 25ª semana da gestação, em concentrações reduzidas, e nestes níveis permanece até o nascimento, aumentando lentamente, estabilizando-se por volta do sexto mês de vida em diante. Estas cadeias, quando ligadas às cadeias alfa (α), darão origem à hemoglobina A₂ ($\alpha\delta_2$).

O gene da cadeia beta (β) globínica é expresso, com pouca intensidade, nos primeiros seis meses de vida, mas a partir deste período ocorre uma mudança quando a síntese de cadeia γ é largamente substituída pela síntese de cadeia β , dando origem à produção da hemoglobina A, que estará presente nos eritrócitos por toda fase adulta. Esta hemoglobina é composta por dois pares de cadeias polipeptídicas ($\alpha_2\beta_2$). O mecanismo pelo qual esta mudança ocorre ainda é desconhecido, parecendo dever-se ao estado de metilação do gene, ou, ainda, ao acondicionamento cromossômico ou a outras condições que podem afetar ou influir na transcrição genética ⁽³⁾.

Apesar das diferenças na estrutura primária das cadeias, suas estruturas secundárias são notavelmente similares. Cada uma possui oito segmentos helicoidais designados pelas letras A até H ^(7,8). As hélices têm um comprimento praticamente idêntico em todas as quatro cadeias normais, exceção feita à hélice D, que contém sete aminoácidos nas cadeias β , γ e δ , mas apenas dois aminoácidos na cadeia α . As hélices perfazem 75% da molécula. Intercalados entre elas estão sete segmentos não helicoidais: NA, AB, CD, EF, FG, GH e HC. Esse arranjo é estruturalmente importante, pois as hélices são relativamente rígidas e lineares, ao passo que os segmentos não-helicoidais permitem dobras ⁽⁸⁾. As estruturas terciária e quaternária da hemoglobina foram estudadas por técnicas de difração de raios-X, especialmente por Perutz e seus colegas ^(7,9). Quando quatro cadeias polipeptídicas se combinam para formar a molécula completa de hemoglobina, cada cadeia fica posicionada aproximadamente nos vértices de um tetraedro regular ⁽⁷⁾. Contatos entre cadeias similares, como $\alpha_1\alpha_2$ e $\beta_1\beta_2$, são limitados e de pequena importância. Os dois principais contatos

entre cadeias distintas foram denominados $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 1\beta 2$. O ponto de contato de $\alpha 1\beta 1$ é extenso e move-se relativamente pouco quando a hemoglobina é oxigenada. O contato $\alpha 1\beta 2$ é menor e o movimento na oxigenação é relativamente grande (até 0,7 nm). Como resultados existem duas estruturas quaternárias para hemoglobina: uma para a forma desoxigenada e uma para forma oxigenada ou com o ligante. A principal diferença entre as duas é a natureza do contato $\alpha 1\beta 2$ ⁽⁸⁾.

Vários aspectos da estrutura das globinas foram altamente conservados ao longo da evolução e são fundamentais para a compreensão das hemoglobinopatias. Em primeiro lugar, a evolução preservou a estrutura terciária do polipeptídeo de globina, de modo que praticamente todas as globinas examinadas possuem os sete ou oito segmentos helicoidais (de acordo com a cadeia) designadas com a letra A até a letra H. A figura 2 ilustra os segmentos não helicoidais que estão indicados por letras maiúsculas e a linha ondulante em negrito representa a disposição espacial dos vários aminoácidos (estrutura secundária). Os aminoácidos estão numerados a partir da porção amino terminal (N) começando com A1. Os números indicam os aminoácidos específicos situados nas posições que podem diferir em várias cadeias de globina. A inserção da cadeia heme não-protéica está entre E7 e F8. Os aminoácidos em E7 (histidina), em E11 (valina) e em HC2 (tirosina) são particularmente importantes para o funcionamento das hemoglobinas de mamíferos. ⁽¹⁰⁾.

Esta configuração é preservada apesar da ampla variação da seqüência. De fato, apenas dois aminoácidos foram conservados em todas as globinas na natureza: a histidina, à qual o ferro da heme se liga covalentemente (resíduo F8)

O estudo da estrutura e evolução da hemoglobina indica que certos tipos de mutações provavelmente são patogênicos. Assim, uma mutação que altere a conformação da globina, substitua aminoácidos altamente conservados, ou desorganize o invólucro hidrófobo por troca de um dos resíduos apolares, tende a causar uma hemoglobinopatia. A preservação da configuração das globinas reflete o axioma de que a forma é um dos principais determinantes da função das proteínas, e muitas mutações alteram a função da hemoglobina através de seu efeito na configuração. O fato de que muitos sítios são semelhantes nas quatro cadeias principais (α , β , δ e γ) da globina exemplifica como a seleção impõe limites rígidos a alguns tipos de alterações em determinadas proteínas. Assim como todas as proteínas, a globina possui “áreas sensíveis” nas quais mutações invariavelmente afetam a função, e “áreas insensíveis”, cuja variação é mais tolerada ⁽¹¹⁾.

1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DA HEMOGLOBINA

As alterações das hemoglobinas envolvem a síntese estrutural ou quantitativa dos aminoácidos que compõem as diferentes cadeias globínicas, bem como as moléculas e enzimas que participam da formação do grupo heme. Quando ocorre a substituição de uma base nitrogenada por outra, resulta na troca de um aminoácido formando uma molécula com características bioquímicas alteradas denominadas hemoglobinas variantes. Em contraste, as talassemias resultam de uma redução quantitativa nas sínteses das cadeias globínicas.

Várias situações anormais dos genes podem afetar a síntese das globinas podendo causar redução ou ausência completa das globinas produzidas. Se o defeito ocorrer nos genes que sintetizam as cadeias alfa haverá diminuição ou ausência de globinas alfa dentro dos eritróides, se o defeito ocorrer no gene para síntese de cadeia beta, haverá diminuição ou ausência de globinas beta, podem ocorrer defeitos em qualquer cadeia globínica e conseqüente diminuição de sua síntese e, portanto elas são denominadas α , β , δ ou γ talassemias. Essa diferença de síntese das globinas promove um desequilíbrio entre as globinas e as conseqüências fisiopatológicas são proporcionais ao desequilíbrio, pois podem ocorrer mais de um tipo de alteração no mesmo indivíduo ⁽¹²⁾. Existem muitas causas de mutações como: agentes químicos, radioativos, deleções ou inserções de bases nitrogenadas, redução ou alterações no processo de tradução e transcrição dos genes ou ainda alterações causadas por pareamento desigual entre os cromossomos durante o processo de “*crossing-over*”. Podem também ocorrer hemoglobinopatias não hereditárias causadas por doenças mielóides, malárias, ferropenias ou por uso de determinadas drogas. Algumas mutações estruturais podem produzir um grupo de hemoglobinas variantes denominadas instáveis. A estrutura tetramerizada da molécula de hemoglobina se mantém estável por meio de importantes ligações efetuadas por aminoácidos com pontos de contato entre as cadeias alfa1-beta1 ($\alpha_1\beta_1$) outro ponto de estabilização química é verificado na superfície interna da hemoglobina, onde os aminoácidos protegem o grupo heme da oxidação. A substituição de qualquer um destes aminoácidos por outro com características físico-químicas diferentes como, por exemplo tamanho, ponto isoelétrico e polaridade desestabilizará a molécula,

permitindo o acesso da água para o interior do grupo heme oxidando-o. Em seguida as globinas desagregadas precipitam-se no interior dos eritrócitos sob a forma de corpos de heinz que vão se fixar na membrana do eritrócito alterando-lhe a permeabilidade e osmose, causando sua destruição precoce.

As desordens na molécula de hemoglobina são geneticamente determinadas, e podem envolver complexas interações entre vários e diferentes genes mutantes ^(13,12).

Embora as hemoglobinopatias e talassemias sejam dois grupos distintos geneticamente, clinicamente apresentam as mesmas manifestações que incluem: anemia de variável severidade, com microcitose e hipocromia dos eritrócitos, aumento da reabsorção do ferro, diabetes *mellitus*, atraso no desenvolvimento sexual e considerável morbidade e mortalidade.

1.3 DEFINIÇÃO E HISTÓRICO DA BETA-TALASSEMIA

O termo talassemia foi empregado pela primeira vez em 1936 por Whipple e Bradford que pretenderam com esse nome, chamar a atenção para incidência em populações de origem mediterrânea (*thalassa*, do grego, mar) de um tipo de anemia infantil que fora descrito por Cooley e Lee em 1925 ^(1,14).

Von Jaksch, entre 1889 e 1890, descreveu três pacientes com anemia severa e propôs o nome de "*anemia infantum pseudoleucaemica*". Embora pareça improvável que esses pacientes tivessem talassemia como se sabe hoje, os termos "anemia de Von Jaksch" e "*anemia pseudoleucemica*" rapidamente

ganharam amplo uso. Pelos 50 anos seguintes, pacientes que indubitavelmente tinham talassemia foram classificados sob essas designações ⁽¹⁵⁾. A talassemia não havia sido identificada como entidade clínica até 1925, quando Thomas Cooley e Pearl Lee descreveram uma síndrome de ocorrência entre crianças de descendência italiana, caracterizada por uma anemia profunda, esplenomegalia e deformidades ósseas ⁽¹⁴⁾. Nesse período, uma manifestação clínica branda foi descrita, independentemente, por vários investigadores italianos ^(16 17,18). Em 1938, Caminopetros observou que os pais de uma criança que sofria de talassemia grave tinha a fragilidade osmótica das hemácias aumentada. No início da década de 50, seguindo as descobertas das bases moleculares da anemia falciforme por Linus Pauling e colaboradores, o padrão de hemoglobinas de pacientes com diferentes formas clínicas da talassemia foi estudado em muitas partes do mundo, revelando sua expressão extremamente heterogênea. Vernom Ingram e Anthony Stretton analisaram o padrão de hemoglobinas de pacientes de diferentes formas clínicas de talassemias, sugerindo uma classificação em dois grupos principais, α e β -talassemias, de acordo com o desequilíbrio de síntese de cadeias ou da globina. O desenvolvimento de métodos para o estudo da síntese de hemoglobina “*in vitro*” conduziu a validação experimental desta classificação e auxiliou o diagnóstico clínico. No começo dos anos 70, devido ao maior conhecimento do controle genético da expressão das hemoglobinas humanas, muitas variantes estruturais e alterações na biossíntese de hemoglobinas foram caracterizadas e a heterogeneidade das talassemias foi estabelecida. Mais de 200 pontos de mutações no gene da globina e raras deleções têm sido reportados como responsáveis pela redução de síntese das globinas ^(12, 19,26).

A β -talassemia é uma doença autossômica recessiva, monogênica, hereditária, porém não congênita caracterizada por uma alteração quantitativa na síntese de globinas β da hemoglobina A, e é um dos distúrbios genéticos mais freqüentes do homem e mais difundidos no mundo ^(19,20). Poucas são as populações isentas, sendo sua presença em extensas regiões responsável por problemas de saúde pública. Em geral, altas prevalências em uma área podem ser resultantes de dois mecanismos: a doença se desenvolve na população por força do efeito seletivo da malária ou, alternativamente, é introduzida pela imigração de uma população previamente afetada. O primeiro mecanismo, ou seja, a seleção de heterozigotos em áreas altamente malarígenas, explica as elevadas freqüências nos países confinantes com o Mediterrâneo, no Oriente Médio, no Sudoeste da Ásia e na África. Por outro lado, a imigração, espontânea ou forçada é responsável por sua ocorrência nos países do Novo Mundo, incluindo o Brasil. Importante salientar que a introdução da malária no continente americano ocorreu em época relativamente recente, após a chegada dos colonizadores europeus e, portanto não contribuiu para aumentar a prevalência de hemoglobinopatias, por isso, repetidos estudos em populações indígenas não miscigenadas demonstram completa ausência destes distúrbios ⁽²¹⁾. As beta-talasseмии exibem acentuada heterogeneidade, quer quando analisadas em seus aspectos clínicos, quer no âmbito bioquímico, genético ou molecular. São classificadas geneticamente como: talassemias β^0 (beta zero) quando há ausência completa da produção de cadeia β , e talassemias β^+ (beta mais) quando se deprime apenas parcialmente a síntese de cadeias β . Assim, indivíduos homozigotos herdam dois genes para β -talassemia, ou ainda podem

ser heterozigotos compostos e não produzem HbA, mas apenas HbF e HbA₂, contrastando com os indivíduos heterozigotos que herdam apenas um gene para β -talassemia e produzem HbF e HbA₂ em quantidades variáveis (10-80%) e também HbA. De acordo com o ponto de vista clínico a beta-talassemia pode ser classificada em: major, intermédia e minor, ocorrendo um amplo espectro de variações hematológicas e clínicas em todas as formas. Há ainda algumas formas de traço talassêmico clínica e hematologicamente assintomáticas e, portanto, denominados como “portadores silenciosos”⁽²²⁾. Finalmente, é possível uma subclassificação de acordo com a mutação responsável pelo defeito na síntese da cadeia⁽²³⁾.

O padrão de herança das talassemias, assim como o de outras alterações genéticas da hemoglobina, é autossômico recessivo. Com a síntese de globinas β alterada a relação alfa-beta supera o valor do equilíbrio que é de um , e o excesso de globinas α livre nos eritrócitos torna-se instável e se precipita, causando danos à membrana, destruindo prematuramente o eritrócito e provocando anemia. O excesso de ferro não ligado ao grupo heme tem uma ação oxidante que contribui para um desequilíbrio nas bombas de cálcio e potássio que também alteram a membrana das células precursoras do eritrócito facilitando ainda mais a sua destruição precoce, processo denominado de eritropoese ineficaz. Estudos demonstraram que o desequilíbrio da síntese de globinas nos beta-talassêmicos heterozigotos não está restrito ao reticulócito do sangue periférico, mas compromete também os precursores eritróides da medula óssea⁽²¹⁾. Um efeito direto da anemia é o aumento da produção de eritropoietina, que causa uma intensa proliferação e expansão da medula óssea resultando em

deformidades do esqueleto. Complicações secundárias envolvem esplenomegalia, danos cardíacos e endócrinos, além de absorção gastrointestinal do ferro em excesso pela anemia e transfusões sanguíneas. As manifestações clínicas da β -talassemia são extremamente diversas abrangendo um amplo espectro desde o estado de dependência transfusional na talassemia major até o estado assintomático do traço talassêmico ^(24,25).

1.4 ORIGEM GENÉTICA DA BETA TALASSEMIA

A gênese das cadeias globínicas é regulada por grupamentos de genes nos cromossomos 11 e 16 nos períodos embrionário, fetal e adulto sintetizando as diferentes cadeias independentemente. O complexo gênico para β globina contém 1600pb encontra-se no cromossomo 11 (11p15. 5) e inclui os genes (ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ , e β) e um pseudogene ($\psi\beta$) ^(3,24). O pseudogene possui seqüência homóloga aos genes ativos, mas não funcionais. O gene ϵ expresso na fase embrionária está distante 15 Kb do gene $G\gamma$. Os genes $G\gamma$ e $A\gamma$ diferem em apenas um aminoácido na posição 136, estão distantes entre si 3,5 Kb e possuem expressão característica do período fetal. O gene δ está distante do $A\gamma$ por 14 Kb e o gene β está distante 5,4 Kb do gene δ . Cada um desses genes consiste de um segmento na região promotora 5', uma pequena região não traduzida UTR, *codons de iniciação*, três *exons* e dois *introns*, também conhecidas como *Intervining seqüence (IVS)*, *codon de terminação*, uma UTR 3' e sinal de poliadenilação ^(25,26). Os *introns* interrompem a seqüência de códigos na junção dos *codons* por aminoácidos 30-31 e 104-105. O primeiro *intron*, (IVS-

I) tem 122-130 pares de bases (pb), enquanto o segundo (IVS-2) tem 850-904 pb de comprimento, possui 50Kb. Importantes seqüências conservadas para expressão do gene da β globina estão na região promotora localizada na extremidade 5' e apresentam várias seqüências de nucleotídeos conservados envolvidos no controle da transcrição. A primeira seqüência é caracterizada por ser rica em nucleotídeos adenina e timina sendo denominada TATA box, e a segunda seqüência conservada é constituída de nucleotídeos GGC/TCAATCT denominada CAT box, e encontra-se duplicada nos genes γ , e a seqüência CCACCCT, duplicada no gene β . Outras regiões fundamentais para o controle da expressão dos genes do complexo β , é a região controladora de locus (*LCR*), junção *exon-intron* e a região não traduzida 3' (*3'UTR*, "*unstranlated region*") no final da seqüência da molécula do RNAm. A região 5' não traduzida (*5'UTR*) ocupa um trecho de 50 nucleotídeos, entre a região do sítio *Cap* do RNAm da β globina e o *codon* de iniciação (ATG). Há duas seqüências conservadas na *5'UTR* de vários genes da α e β -globinas ^(3,25,27) : uma é o hexanucleotídeo CTTCTG e a outra é CACCATG, na qual os três últimos nucleotídeos compõem um *codon* de iniciação. A *3'UTR* constitui a região entre o *codon* de finalização e a cauda de poli A (região de poliadenilação). São 132 nucleotídeos com uma seqüência conservada, AATAAA, localizada a 20 nucleotídeos da cauda de poli A. Esse hexanucleotídeo é um sinal de clivagem da região 3' para a adição da cauda de poli A, que oferece estabilidade do processamento do RNAm e induz a tradução, isto é, a síntese da cadeia β -globina. O *exon 2* codifica os resíduos envolvidos na ligação heme e formação do dímero $\alpha\beta$, enquanto *exon 1* e o *exon 3* codificam regiões da cadeia globínica não ligantes à heme. Muitos dos

aminoácidos envolvidos na interação das subunidades globínicas, que interferem no efeito Bohr ou na ligação da 2,3-DPG (2,3 – difosfoglicerato) são encontrados no *exon 3* ⁽³⁾. Conseqüentemente, a ocorrência de mutação no *éxon 3* pode afetar a afinidade do oxigênio pela hemoglobina ou interferir na acomodação da molécula de 2,3 DPG entre as cadeias da β -globina ($\beta_1 \beta_2$). O complexo gênico para α globina encontra-se no braço curto do cromossomo 16 na região (16 p13.3) contém dois *locus* e compreende os genes ξ , $\psi\alpha_1$, α_2 e α_1 . Os genes do complexo gênico alfa são separados por 5 regiões estruturalmente hipervariáveis (*HVRs*- “*Hyprvariable regions*”) Cada uma dessas regiões é composta de múltiplos segmentos repetitivos de pequenas seqüências ricas em GC, apresentando tamanho variável de 17 a 57 pb. Na extremidade 5’ a aproximadamente 40 Kb à montante do *cluster* alfa encontra-se uma região denominada *HS-40*. Essa região é hipersensível à enzima DNase e um sítio de união para fatores de transcrição. Sua integridade é essencial para expressão dos genes deste *cluster* ⁽²⁸⁾.

As mutações responsáveis pela beta-talassemia compreendem deleção de um ou mais nucleotídeos, inversão ou rearranjo de seqüências de DNA, mas a grande maioria são mutações pontuais no gene da β -globina ⁽²⁹⁾. Quase todas as possibilidades de defeito podem afetar a expressão do gene, desde a transcrição, a tradução ou ainda a estabilidade do RNA. Há também algumas formas de hemoglobinas variantes sintetizadas de forma ineficiente, que são instáveis e resultam em deficiência funcional de cadeia β , gerando um fenótipo talassêmico ^(19,20).

A variabilidade de manifestações clínicas deve-se às interações das mutações que afetam de modo variável a expressão dos genes da beta globina que incluem co-herança com α -talassemia ou ainda aumento da expressão do gene da gama globina⁽²²⁾.

Mutações que reduzem a abundância do RNAm da β - globina são geralmente oriundas de alterações da região promotora, no processo de “*splicing*” (emenda) do RNAm, da região “*Cap*” (cobertura) ou da região de terminação (*cauda de poli A*) do RNAm. Outras alterações geram polipeptídeos instáveis, resultantes de defeitos na região codificadora, designadas sem sentido (“*nonsense*”), ou na matriz de leitura (“*frameshift*”).

As seqüências de DNA necessárias ao início correto da transcrição do gene da β - globina localiza-se no promotor dentro de cerca de 200 pares de bases a montante do sítio iniciador da transcrição. O promotor da β -globina, a exemplo de muitos outros promotores gênicos, consiste numa série de elementos funcionais relativamente curtos que se acredita interagirem com proteínas que regulam transcrição, incluindo, no caso dos genes da globina, as proteínas que controlam a expressão específica desses genes nas células eritróides, que compõem o tecido no qual a hemoglobina é produzida⁽¹¹⁾.

As deleções eventos raros, para β -talassemia apresentam-se freqüentemente isoladas e pode ocorrer em qualquer local do gene codificador da cadeia beta, atingindo uma quantidade variável de bases. As deleções são divididas em dois grupos distintos, diferenciados pela quantidade de pares de bases deletados. No primeiro grupo estão as pequenas deleções que envolvem a exclusão de desde 7 pares de bases até 1605 pares de bases. No segundo grupo

estão as grandes deleções que atingem um número maior que 1605 pares de bases deletados e ocorrem geralmente nas regiões 3' e 5'- UTR da fita gênica da β - globina ^(30,31). Atualmente, a maioria das β -talassemias é causada por mutações não - deletérias. Cada uma destas mutações descritas é característica de uma determinada região do globo e afeta principalmente, mas não exclusivamente, a população desta região por esta razão tem sido possível determinar um espectro de mutações específicas para populações de risco ⁽³²⁾. A ampla variedade de mutações existentes para esta doença genética é o mais importante exemplo de heterogeneidade alélica ⁽³³⁾.

As mutações não-deletérias que causam a β -talassemia podem ser divididas em subgrupos, conforme a alteração observada nas várias etapas de síntese do produto do gene da β - globina.

1.4.1 Mutações Transcricionais

A maioria destas mutações é pontual e estão concentradas, ou na região TATA box, ou também nas duas seqüências CACACCC nas posições -90 e -105 em relação ao *Cap* ⁽³⁴⁾. Algumas mutações estão associadas a leves alterações no fenótipo. Um exemplo é a substituição na posição -101 que troca uma citosina por uma timina (C \rightarrow T), envolvendo um dos elementos promotores da transcrição. Este genótipo está associado com uma β -talassemia silenciosa, ou seja, um fenótipo completamente normal, freqüente na região do Mediterrâneo.

Várias mutações puntiformes nas seqüências promotoras reduzem a ligação da RNA-polimerase e, portanto reduzem a taxa de transcrição de 75 a 80%. Todas estas alterações que ocorrem na região promotora e na região 5'-UTR levam invariavelmente a um quadro de β^+ -talassemia ⁽²⁶⁾.

1.4.2 Mutações que afetam o RNA *Splicing*

As mutações que alteram o RNA *splicing* constituem a causa mais comum de talassemia ⁽³⁵⁾. A maioria afeta *introns*, entretanto, algumas foram localizadas no interior de *exons*. Se a mutação alterar as junções de emenda normais, não ocorrerá *splicing*, e todo o RNAm formado será anormal. O RNAm não-emendado é degradado no interior do núcleo, resultando em β° -talassemia.

As ligações em *exons* e *introns* são marcadas por dinucleotídeos invariantes GT no lado 5'-UTR, ou, "lado doador" e AG no lado 3'-UTR, ou, "lado receptor". Mudança em uma única base dentro de uma "*Splice Junctions*" impede totalmente o RNA "*Splicing*" normal, resultando em fenótipos de β° - talassemia. Nas proximidades destes nucleotídeos invariantes, que demarcam as "*Splice Junction*", existem seqüências altamente conservadas e envolvidas no processamento do RNA mensageiro. Diferentes variantes da β -talassemia envolvem a substituição de um único nucleotídeo dentro da seqüência consenso do IVS-1 "doador". Estas mutações são particularmente interessantes, pois estão associadas à ocorrência de um fenótipo singular. Um exemplo disso são as substituições da guanina da posição 5 do IVS-1 por uma timina (G→T) ou citosina (G→C), resultando em uma β^+ -talassemia severa. Por outro lado a troca

de uma timina por uma citosina (T→C) na posição 6, comum na região mediterrânea, resulta comumente em uma forma muito leve de β^+ -talassemia ⁽³⁵⁾. O processamento do RNA também é afetado por mutações que criam um novo local de *Splice* dentro de *exons* ou *introns*. Nestes casos o fenótipo irá variar conforme a frequência de uso destes novos locais de “*Splice*”, comparado com o normal. Um exemplo desta mutação é a substituição de uma guanina por uma adenina (G→A) na posição 110 do IVS-1, que é uma das formas mais comuns de β -talassemia na região mediterrânea, fazendo com que cerca de somente 10% dos *splicing* ocorram nos locais normais, resultando então em uma β^+ -talassemia severa. De forma similar, a mutação que produz um novo local de quebra na posição 116 do IVS-1 resulta, na maioria das vezes, em uma β^o -talassemia por produção insuficiente de RNA mensageiro. Várias mutações estão descritas como geradoras de novas regiões “doadoras” dentro do IVS-2 do gene da β globina ⁽³⁶⁾. Outro interessante mecanismo de “*splicing*” anormal é a ativação de locais “doadores” dentro dos *exons*, como ocorre no “*Cryptic donor site*”, dentro *exon* 1, na região dos *codons* 24-27. Este local contém um dinucleotídeo GT, onde a substituição de um nucleotídeo adjacente a ele altera a seqüência dos nucleotídeos, tornando esta região parecida com um “*Splice Site*”. O resultado disso é a ativação desta região, produzindo um anormal *splicing* do RNA mensageiro. Há ainda uma variedade de outras mutações em “*Cryptic Sites*” dentro de *introns* e *exons* já descritas.

Outra classe de mutações no processamento do RNA mensageiro inclui a clivagem da extremidade 3’ do RNAm e adição da cauda poli A que são controladas, pelo menos em parte, em uma seqüência AAUAAA, de

aproximadamente 20 pares de bases antes do sítio de poliadenilação. Mutações nesse sinal de poliadenilação levam a um fenótipo de β^+ - talassemia revelando a importância desse sinal para a adequada clivagem 3' e adição da cauda poli A ⁽³⁾.

Todos os RNAm sofrem modificações pós transcricionais fora da região codificadora, necessárias à estabilidade e funcionalidade da proteína. Alterações na região designada *cap* do RNAm (sítio de cobertura na extremidade 5') podem impedir o acréscimo de 7-metilguanossina, expondo assim o RNA à degradação ⁽¹¹⁾.

1.4.3 Mutações que alteram a tradução do RNA mensageiro

1.4.3.1 Mutações *Nonsense*

São aquelas que trocam as bases de um *codon* que codifica um aminoácido para um *codon* que codifica uma terminação, impedindo a tradução correta do RNAm. Todas as mutações "*nonsense*" (sem sentido) conhecidas atualmente resultam em fenótipos de β^0 -talassemia.

Na população brasileira tem sido relatada alta incidência de uma mutação desse tipo, no *codon* 39 ^(37,38,39). O gene terminador de cadeia de maior significado numérico é o que contém a mutação "*nonsense*" do *codon* 39 (CAG→TAG), representando 30% dos alelos da β - talassemia observada em indivíduos da Grécia e Itália e marcadamente responsável pelo fenótipo β^0 -talassemia na população da Sardenha ^(40 41,42,43).

1.4.3.2 Mutações Frameshift

Outro tipo de mutação que gera uma terminação prematura da transcrição é designado “*frameshift*” (desvio estrutural), em que a deleção ou inserção de um, dois ou quatro nucleotídeos na região codificadora muda o grupamento dos tripletos de nucleotídeos, ou *códons*, interferindo na seqüência normal de leitura da fita gênica, e desse modo interrompendo a mensagem do gene no trajeto subsequente à mutação. Nesse caso, o desvio ocorrente na estrutura da leitura gera *codons* terminadores. As mutações “*nonsense*” e “*frameshift*” são comuns na Índia e resultam invariavelmente em β^0 - talassemia ^(40, 43,44,45).

1.4.3.3 Mutações no *Codon* de Iniciação

Mutações que envolvem a iniciação, alongação ou terminação da cadeia da β -globina resultam sempre em uma β^0 -talassemia, já que o sinal para que ocorra a iniciação da transcrição gênica foi perdido ⁽³⁵⁾. A tabela 1 demonstra as mutações mais comuns de β -talassemia nas populações do mediterrâneo e afro-americanos.

Tabela 1-Distribuição dos pontos de mutações mais comuns de β -talassemia nas populações do mediterrâneo e afro-americanos. Modificado de OLD, 2003 ⁽⁴⁶⁾.

| Mutação | Mediterrâneo | | | Africano |
|-----------------|--------------|--------|---------|----------------|
| | Itália | Grécia | Turquia | Afro-americano |
| - 88 (C→T) | | | | 21,4 |
| - 87 (C→G) | 0,4 | 1,8 | 1,2 | |
| - 30 (T→A) | | | 2,5 | |
| - 29 (A→G) | | | | 60,3 |
| CD5 (-CT) | 1,2 | 1,8 | | |
| CD6 (-A) | 0,4 | 2,9 | 0,6 | |
| CD8 (-AA) | | 0,6 | 7,4 | |
| CD15 (G→A) | | | | 0,8 |
| CD24 (T→A) | | | | 7,9 |
| CD39 (C→T) | 40,1 | 17,4 | 3,5 | |
| IVSI-I (G→A) | 4,3 | 13,6 | 2,5 | |
| IVSI-6 (T→C) | 16,3 | 7,4 | 17,4 | |
| IVSI-110 (G→A) | 29,8 | 43,7 | 41,9 | |
| IVSII-I (G→A) | 1,1 | 2,1 | 9,7 | |
| IVSII-745 (C→G) | 3,5 | 7,1 | 2,7 | |
| Outros | 4,1 | 2,2 | 9,7 | 10,6 |

1.5 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA B-TALASSEMIA

As talassemias são as mais comuns desordens monogênicas na população mundial ^(24,46, 47). Elas estão entre as primeiras doenças que foram estudadas pelos métodos de biologia molecular e permanecem como primeiro modelo para o entendimento da relação entre patologia molecular e diversidade fenotípica ⁽⁴⁸⁾. Cerca de 3% da população mundial (150 milhões de habitantes) é portadora de genes para a β - talassemia. Estes genes são particularmente prevalentes em habitantes da Itália e Grécia ⁽³⁹⁾. A β -talassemia é mais prevalente nos povos de origem mediterrânea, onde houve grandes endemias de malária, enquanto que a α - talassemia é mais prevalente no sudeste asiático. Apesar disso, ambas têm sido identificadas em todos os povos e com freqüências

diversas, revelando que sua ocorrência tornou-se um problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento ⁽⁴⁹⁾.

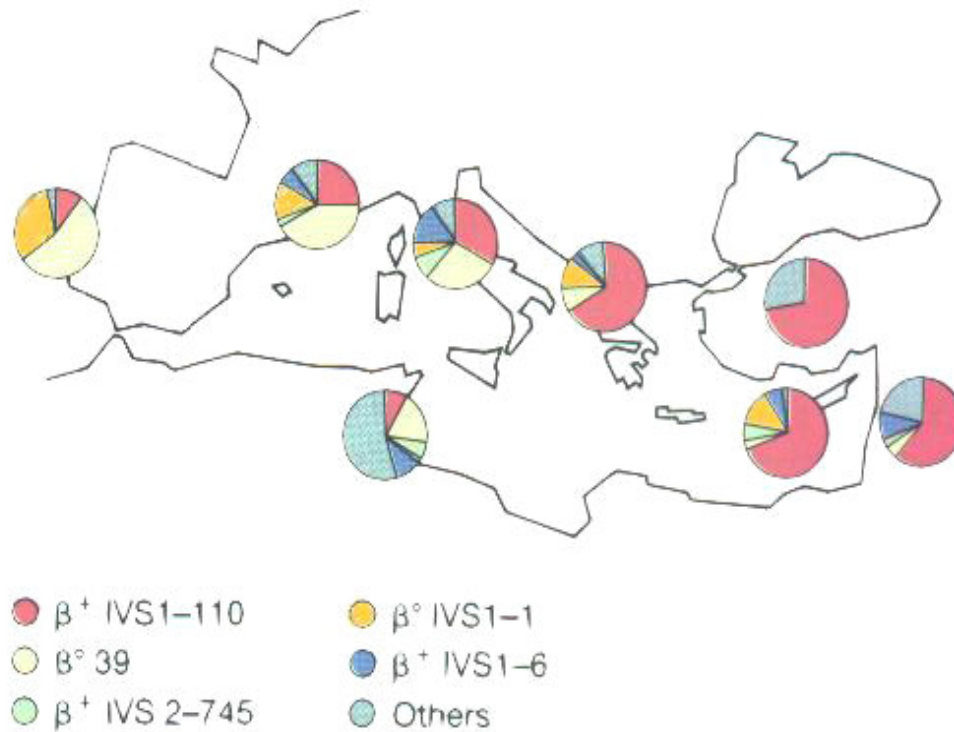


Figura 3 - Distribuição geográfica, na região do mediterrâneo, das principais mutações para β -talassemia. Adaptado de Cao, 1997 ⁽⁵⁰⁾

Considerada a origem heterogênea da população brasileira, não é surpreendente que os defeitos hereditários da hemoglobina sejam freqüentes em nosso meio. Além dos europeus que aqui se fixaram no período colonial, de origem predominantemente portuguesa, o país recebeu cerca de 2,5 a 4 milhões de negros africanos. Entre 1819 e 1947, fixaram-se no Brasil cerca de 5 milhões de imigrantes, predominando italianos (1,5 milhão), portugueses (1,4 milhão), espanhóis, alemães e japoneses. A ocupação desses povos foi bastante irregular nas diferentes regiões do país ^(20,21,51,52).

No Brasil as alterações comumente observadas e com implicações clínicas são: a hemoglobinopatia S (anemia falciforme) e a β -talassemia ^(53,54).

A dispersão dos genes para as hemoglobinas variantes e talassemias no Brasil está intimamente relacionada à formação étnica da população brasileira, envolvendo o processo de colonização. Enquanto a anemia falciforme foi introduzida no Brasil pelo tráfico de escravos, a β -talassemia foi inserida mais tarde, devido à massiva imigração, principalmente italiana, entre 1870 a 1953, para a região sudeste ^(55,56). Portanto, a população apresenta diversidade nas origens raciais, com variado e progressivo grau de miscigenação ^(57,58,59), fato que certamente influenciou a prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes nas diversas regiões do Brasil ^(60,61,62,63).

Dados encontrados em estudos realizados nas regiões Sudeste e Nordeste indicaram um perfil diferente de mutações para β talassemia entre essas populações (tabela 2), onde a ocorrência da mutação no códon 39 (C \rightarrow T) varia entre 47-54% na região sudeste ⁽⁵³⁾.

Tabela 2- Comparação da distribuição (%) das mutações para β -talassemia entre o Nordeste (Recife) e o Sudeste (Ribeirão Preto e Campinas) do Brasil Adaptado de Araújo, 2003 ⁽⁵³⁾.

| Mutação | Recife (N=86) | Ribeirão Preto (N=57) | Campinas (N=70) |
|-------------------|------------------|--------------------------|--------------------|
| Códon 39 (C → T) | 3,5 % | 47,0 % | 54,0 % |
| IVS-I-6 (T → C) | 62,8 % | 15,0 % | 18,6 % |
| IVS-I-110 (G → A) | 8,2 % | 27,0 % | 18,6 % |
| IVS-I-1 (G → A) | 15,1 % | - | 4,3 % |
| IVS-I-5 (G → C) | 9,3 % | - | - |

O conhecimento da prevalência, freqüência e distribuição das principais mutações em que a beta-talassemia existe são de particular importância para a correlação genótipo-fenótipo e detecção dos portadores para a implantação de um correto e eficiente programa de aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal ⁽⁶⁴⁾.

1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA B-TALASSEMIA

Em 1975, o Comitê Internacional de Padronização em Hematologia lançou um painel de recomendações visando diagnóstico e investigação laboratorial das hemoglobinas anormais e talassemias. Os testes iniciais recomendados incluem quantificação dos eritrócitos e demais índices hematimétricos, dosagem de ferro e ferritina, eletroforese de hemoglobina em meio alcalino, teste de solubilidade, falcização e quantificação de HbA₂ e HbF. Se alguma hemoglobina anormal for identificada, aplicam-se técnicas de maior resolução: eletroforese de globinas,

cromatografia líquida de alta performance (HPLC), focalização isoelétrica (IEF) e análise molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR) ⁽¹²⁾.

Vários guias de orientação laboratorial têm sido publicados, em que profissionais da área reúnem suas experiências e sumarizam os passos necessários para a investigação das hemoglobinopatias e talassemias. A sensibilidade e praticidade do HPLC tem sido destacada como estratégia diagnóstica para quantificação de HbA₂ e HbF e também para desordens complexas. Outro aspecto abordado é a atenção para a identificação dos duplos heterozigotos para certas variantes estruturais e talassemias que podem também levar à severidade clínica da doença ^(12,65).

As talassemias geralmente são classificadas como anemias microcíticas e hipocrômicas, portanto a chave do diagnóstico está na dosagem dos índices hematimétricos VCM e HCM, que nas talassemias estarão com valores reduzidos (VCM < 78fL e HCM < 27pg), embora nas anemias por deficiência de ferro, estes índices também sejam reduzidos ^(12,29,45,64). O diagnóstico diferencial das anemias microcíticas é complexo e sua investigação laboratorial de custo elevado. O uso de índices hematimétricos para racionalizar a abordagem diagnóstica tem sido proposto para contornar essa problemática ^(66,67,68). Também tem sido observado que para um mesmo grau de anemia, os eritrócitos na β -talassemia são mais microcíticos do que na anemia ferropriva, conseqüentemente o volume corpuscular médio (VCM) tende a ser menor e a contagem de eritrócitos maior em casos de β -talassemia ^(69,70,71,72).

Um esquema simplificado, baseado nos valores de HbA₂, HbF, VCM, HCM e nas características morfológicas das hemácias, pode ser utilizado no

rastreamento dos diferentes tipos de talassemia e suas interações, conforme descrito na tabela 3 ⁽⁴⁶⁾:

Tabela 3-Valores de VCM, HCM e perfil de hemoglobina por eletroforese no indivíduo normal, na β -talassemia e na deficiência de ferro. Adaptado de Old, 2003⁽⁴⁶⁾.

| | Normal | β -talassemia | Deficiência de ferro |
|----------------------------------|--|---|------------------------|
| VCM (fL) | > 78 | < 78 | < 78 |
| HCM (pg) | > 27 | < 27 | < 27 |
| Perfil eletroforético (%) | HbA: 96-98% HbA ₂ < 3,5% | HbA ₂ ≥ 3,5 HbF: 0,1 - 7,0% | HbA ₂ < 3,5 |

A importância da implantação do diagnóstico das talassemias deve-se ao fato de estar presente em todas as populações, particularmente em sociedades multiculturais como ocorre no Brasil ⁽⁷³⁾.

A ocorrência da β -talassemia neste país é conhecida de longa data, mas os métodos usuais para o estudo desta anomalia genética sempre apresentaram algumas limitações, fato que dificultou a obtenção de dados mais completos e fidedignos ^(21,74).

A frequência de heterozigotos na população miscigenada do sul do Brasil é de 0,8 a 1,1% ^(21,75). Em 1996 o estado de São Paulo tinha cerca de 40 milhões de habitantes e há uma estimativa de 300 homozigotos para talassemia sob tratamento pelo sistema de saúde do estado ⁽⁷⁶⁾.

Como a maioria das mutações é regionalmente específica, um espectro de mutações tem agora sido determinado em populações de risco ⁽⁴⁶⁾.

O estudo de triagem para identificar as mutações em β -talassemia é baseado no conhecimento das mutações mais raras e mais comuns de um determinado grupo étnico, ao qual pertencem os indivíduos a serem

diagnosticados. De modo geral, as mutações são analisadas por PCR, que permite a detecção de múltiplas mutações simultaneamente, sendo essas identificáveis em mais de 90% dos casos ⁽⁴⁶⁾.

A heterogeneidade da β -talassemia no Brasil torna necessária a realização de mais estudos para elucidação de suas bases moleculares ^(21,53).

Muitos trabalhos demonstram as diferentes origens moleculares do fenótipo beta talassêmico. Esses estudos são importantes para diagnosticar e prevenir complicações clínicas, além de possibilitar o entendimento da patologia molecular do fenótipo β talassêmico ^(1,3,21,76,77).

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar a eficiência do uso combinado dos índices hematimétricos, parâmetros bioquímicos e avaliação das características morfológicas das hemácias no rastreamento de pacientes portadores de β -talassemia heterozigótica num hospital público universitário.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as alterações moleculares descritas como mais freqüentes nos pacientes com perfil laboratorial (bioquímico e hematológico), sugestivo de β -talassemia.
- Confrontar a correspondência dos dados obtidos com a descrição da literatura.

3. MÉTODOS

Este estudo foi realizado mediante a aprovação da comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa (CAPEPESQ) sob o número 824/05.

O estudo foi realizado com amostras de sangue periférico obtidas de pacientes de ambos os sexos e origens étnicas diferentes que utilizam a Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (DLC-HC-FMUSP). O número total de pacientes avaliados foi de 40, sendo um paciente controle, sem alterações laboratoriais evidentes.

A seleção dos pacientes foi realizada a partir dos resultados de exames de eletroforese de hemoglobina em meio alcalino, realizado rotineiramente no Serviço de Bioquímica Clínica da DLC-HC-FMUSP, exame este que fazia parte da solicitação médica. Numa primeira triagem separaram-se os casos que apresentavam aumento do percentual de hemoglobina A₂ com prova de resistência osmótica positiva, além de alterações hematológicas sugestivas de talassemia.

Foram inclusos os pacientes que apresentaram VCM inferior a 78fL, HCM inferior a 27 pg e percentual de HbA₂, por eletroforese de hemoglobina em meio alcalino, igual ou superior a 3,5%, correspondente ao valor de referência do método utilizado.

Os pacientes inicialmente escolhidos foram convidados por telefone a participar do estudo. Uma vez obtido o aceite verbal foram informados sobre os procedimentos do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Desconsideraram-se os pacientes que haviam recebido transfusão de sangue por pelo menos 60 dias antes da coleta.

Por ocasião da coleta de sangue para o estudo em curso, foram realizados novos exames, bem como a repetição daqueles executados na fase de triagem. Nesta fase os parâmetros foram: índices hematimétricos, ferro e ferritina séricos, caracterização das frações da hemoglobina através de eletroforese alcalina em gel de agarose, resistência osmótica em solução de cloreto de sódio 0,36% (NaCl 0,36%) e confirmação dos valores de HbF e HbA₂ por método de HPLC, além do testes moleculares.

Os estudos moleculares foram realizados no laboratório de virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo e Laboratório de Hemoglobina e Genoma - Hemocentro II – UNICAMP. Houve extração do DNA genômico seguida de amplificação e seqüenciamento para identificação das mutações no gene da β - globina.

O intervalo de tempo para obtenção da casuística ideal foi de aproximadamente 18 meses.

3.1 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue venoso foram coletadas em três tubos de 13 x 75 mm (4,0 mL) contendo o anticoagulante EDTA 5% e um tubo seco de 13 x 100 mm (5,0mL) com volume mínimo de 3,0 mL por paciente Após a coleta as amostras foram encaminhadas à área analítica e conservadas em temperatura de 5°C até o momento da análise, por um período que não excedeu 15 dias.

3.2 PROVA DE RESISTÊNCIA OSMÓTICA

Esta técnica é útil na triagem para detecção da β -talassemia, particularmente na forma heterozigótica, pois as hemácias microcíticas são mais resistentes à hemólise. Aproximadamente 97% dos portadores de β -talassemia heterozigótica apresentam resultados positivos. Entretanto não é um teste específico, pois nas hemoglobinopatias AS, AC, SS, SC, CC, talassemias α (duas deleções ou doença da hemoglobina H) e na anemia ferropriva podem também ser observados resultados positivos ⁽⁷⁸⁾. A prova é realizada preparando-se uma solução estoque de NaCl 10%, pH 7,4. A solução de trabalho de NaCl 0,36% é preparada à partir da solução estoque.

3.2.1 Procedimento:

Foram transferidos 2,0 mL da solução de NaCl 0,36% em um tubo de ensaio de vidro 13 x 75mm, e adicionados 10 μ L de sangue total, após homogeneização por inversão, as amostras permaneceram em repouso por 10 minutos. Em seguida foi realizada a leitura visual, em que as amostras foram colocadas a uma distância de aproximadamente 2,0 cm de uma folha traçada com três linhas pretas bem visíveis.

3.2.2 Interpretação:

- Uma solução límpida indica resultado negativo (presença de hemólise).

- A presença de turbidez impedindo a visualização dos traços indica resultado positivo (ausência de hemólise), ou seja, hemácias resistentes à hemólise.

3.3 ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA EM MEIO ALCALINO:

Trata-se de um método de separação de moléculas carregadas eletricamente, permitindo a semiquantificação e qualificação de hemoglobinas normais e anormais. As diferentes mobilidades eletroforéticas são originadas por alterações de carga elétrica, causada por substituições de aminoácidos nas cadeias globínicas.

Foi utilizado um sistema automatizado de eletroforese SPIFE/REP (Helena Laboratories Beaumont, Texas U.S.A.) que realiza automaticamente todos os passos desta metodologia incluindo: aplicação da amostra, corrida eletroforética, coloração, descoloração, secagem do gel e leitura densitométrica por meio de um equipamento capacitado a capturar imagens (*scanner*), acoplado a um microcomputador e impressora.

3.3.1 Reagentes Utilizados:

- Gel de agarose em tampão tris-glicina (pH 8,6) com 0,05% EDTA e azida sódica para preservação

- Corante ácido Blue-Stain (5,0g), reconstituído com 50mL de ácido acético e q.s.p. de água deionizada para 1000mL. Concentração após reconstituição de 0,5%
- Descorante ácido cítrico (33g), reconstituído com 11L de água deionizada. Concentração após reconstituição de 0,3%
- Reagente Hemolisante: solução aquosa contendo 0,005% de EDTA, 0,175% de saponina com 0,07% de cianeto de Potássio.

3.3.2 Procedimento:

As amostras de sangue foram preparadas previamente lavando-se as hemácias com NaCl a 0,9%, para obtenção de uma solução de hemoglobina livre de interferentes conforme procedimento descrito a seguir:

- Centrifugação do sangue total, a 18 g (2.500 rpm), durante 10 minutos.
- Remoção total do plasma.
- Lavagem das hemácias com solução de NaCl a 0,9%, na proporção de uma parte de sangue total para duas partes de salina, homogeneizando por inversão até o desprendimento completo do botão de centrifugação.
- Descarte do sobrenadante, mantendo, no mínimo, 3mL de hemácias lavadas.
- O procedimento foi repetido três vezes.

Após as lavagens, as hemácias foram lisadas utilizando-se 20 μ L adicionados a 200 μ L de reagente hemolisante, em seguida 16 μ L foram aplicados no gel de agarose contendo tampão tris-glicina pH 8,6. As amostras e os controles foram submetidos à separação em suas frações pelo processo

eletroforético a 575 volts por 25 minutos e na seqüência coradas e descoradas no aparelho SPIFE/REP (Helena Laboratories Beaumont, Texas U.S.A.). A leitura densitométrica foi realizada em comprimento de onda de 565 nm, no equipamento QUICKSKAN 2000 (Helena Laboratories, Beaumont, Texas) e definida a qualificação e quantificação percentual das frações de hemoglobina presentes.

3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC):

O programa β -talassemia VARIANT™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Califórnia, USA) utiliza os princípios da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), associado à cromatografia catiônica.

O aparelho possui duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de eluição com controles de gradientes pré-programados que passam através de uma coluna analítica. Quando a força iônica da mistura aumenta, as hemoglobinas mais fortemente retidas são eluídas na coluna analítica. Seqüencialmente, um fotômetro de filtro com comprimento de onda duplo (415 e 690 nm) monitora a eluição de hemoglobina da coluna, detectando as alterações de absorbância a 415 nm. O filtro secundário de 690 nm corrige a linha de base para os efeitos provocados pela mistura dos tampões com forças iônicas diferentes. As mudanças na absorbância são monitoradas e exibidas como um cromatograma da absorbância *versus* tempo.

Cada hemoglobina tem um tempo de retenção característico. O tempo de retenção é medido do tempo de injeção de amostra para o ponto máximo de cada

pico. A identificação das hemoglobinas desconhecidas é acompanhada através da comparação de retenção de uma hemoglobina conhecida, analisada no mesmo sistema.

Um integrador interno calcula a regressão dos dados brutos colhidos de cada análise. No final, uma cópia do cromatograma e dados de relatório são automaticamente impressos.

Pequenas diferenças na eficiência de separação de colunas individuais podem ser corrigidas pelo uso do calibrador de hemoglobina A_2/F .

O controle de hemoglobina HbA₂ Lyphochek® (catálogo nº 553) é um produto de controle de qualidade designado para monitorar a precisão dos procedimentos automatizados na quantificação das hemoglobinas HbF e HbA₂.

3.4.1 Reagentes Utilizados:

- Tampão de Eluição: Fosfato de sódio com concentração inferior a 0,05% de azida sódica como preservativo
- Reagente Hemolisante: água deionizada com concentração inferior a 0,05% de azida sódica como preservativo
- Calibrador A_2/F e diluente: Sangue humano hemolisado, liofilizado contendo gentamicina, tobramicina e EDTA como preservativos. Água deionizada com concentração inferior a 0,05% como preservativos. Volume após reconstituição de 10mL por frasco.
- Hemoglobina *Primer*: Sangue humano hemolisado liofilizado com genamicina, tobramicina e EDTA como preservativos. Volume após reconstituição de 1,0mL por frasco.

- Amostras controles: Frascos de 4 x 1mL de sangue humano com valores normais para HbF de 1 - 2% e HbA₂ de 1,8 – 3,2%. Controles com valores anormais de HbF de 5 – 10% e HbA₂ 4 – 6%
- Coluna analítica de troca catiônica, 4,6 mm de diâmetro x 30mm.

3.4.2 Procedimento:

Foram reconstituídos o calibrador HbA₂/F e o “*primer*” de hemoglobina seguindo-se orientação do fabricante. Após foram transferidos 250µL de cada reagente reconstituído e as amostras de pacientes para os copos de amostras e colocados na bandeja de amostras do VARIANT™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Califórnia, USA) para a realização das análises. O fator de resposta da calibração para a hemoglobina A₂ e HbF foi automaticamente calculado.

3.4.3 Interpretação:

Neste trabalho foram adotados os valores sugeridos pelo fabricante do conjunto diagnóstico para HPLC (VARIANT™ - Bio-Rad Laboratories, Inc., Califórnia, U.S.A.) para triagem da β-talassemia e persistência da hemoglobina fetal através dos níveis de HbA₂ e HbF ⁽⁷⁹⁾.

Tabela 4-Valores sugeridos pelo fabricante do método de HPLC (variant™ - bio-rad laboratories, inc., Califórnia, USA) para triagem da β -talassemia e persistência da hemoglobina fetal através dos níveis de HbA₂ e HbF ⁽⁷⁹⁾.

| Estado do paciente | Nível de HbA₂ | Nível de HbF |
|------------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| β -talassemia heterozigótica | 4 a 9% | 1 a 5% |
| β -talassemia homozigótica | Normal ou aumentada | 80 a 100% |
| PHHF heterozigótica | <1,5% | 10 a 20% |
| PHHF homozigótica | Ausente | 100% |

3.5 DOSAGEM DE FERRO E FERRITINA NO SORO

As determinações de ferro (não-heme) são utilizadas no diagnóstico e tratamento de doenças como anemia por deficiência de ferro, hemocromatose, doenças crônicas renais, anemias microcíticas e macrocíticas e perturbações metabólicas de origem desconhecidas ⁽⁸⁰⁾.

Em condições ácidas, o ferro é liberado da transferrina e reduzido de Fe⁺⁺⁺ para Fe⁺⁺ com a utilização do reativo ascorbato e em seguida reage com ferrozine e forma um complexo corado. A intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de ferro, podendo ser determinada fotometricamente ⁽⁸¹⁾.

A determinação da ferritina é necessária no diagnóstico do metabolismo do ferro, na avaliação das reservas de ferro e no diagnóstico diferencial das anemias. A ferritina detectável no sangue está em equilíbrio com o ferro depositado no organismo e, portanto atua como indicador dos níveis dos depósitos de ferro ⁽⁸²⁾.

O princípio imunoturbidimétrico consiste na reação dos anticorpos antiferritina acoplados a micropartículas de látex com o antígeno, formando um complexo antígeno-anticorpo medido por turbidimetria ⁽⁸³⁾.

3.5.1 Procedimento:

As dosagens de ferro e ferritina séricas foram realizadas no analisador bioquímico automatizado Roche/Hitachi MODULAR®ANALYTICS P800 (Roche's Diagnostics Division, Basel, Switzerland), seguindo-se as orientações do fabricante.

3.6 HEMOGRAMA

O exame de hemograma foi realizado no equipamento SYSMEX XT2000i (Roche's Diagnostics Division, Basel, Switzerland). São analisadores de hematologia para diagnóstico "*in vitro*", baseia-se no princípio da impedância. São parâmetros utilizados para diagnóstico diferencial e classificação das anemias microcíticas, macrocíticas e normocíticas, hipocrômicas e normocrômicas, avaliando tamanho, forma e cor das hemácias. As amostras e controles foram analisados seguindo-se orientações do fabricante.

3.6.1 Esfregaço Sanguíneo

A confecção do esfregaço e sua coloração permitem uma avaliação morfológica das células sanguíneas.

3.6.2 Procedimento

Transferiu-se uma gota de sangue total sobre a extremidade da lâmina de vidro lapidada 26 x 76 mm e com o auxílio de uma segunda lâmina foi realizado o esfregaço. Após foi realizada coloração automatizada no corador de lâminas (HemaTek 2000 Bayer, Elikart, U.S.A.) com corante de Leishman e a leitura microscópica foi realizada com aumento de 1000 vezes.

3.7 SISTEMA DE GESTÃO DA QUALIDADE, ACREDITAÇÃO LABORATORIAL E ENSAIOS DE PROFICIÊNCIA NA DLC - HC-FMUSP.

A DLC-HCFMUSP é certificada pelas normas ISO 9000 desde 1997, e certificada pelas normas ISO 9001:2000 desde 2003. A aprovação no Programa de Acreditação para Laboratórios Clínicos da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica Medicina Laboratorial (PALC - SBPC/ML) ocorreu em 2006. Participa regularmente dos ensaios de proficiência do Programa de Excelência para Laboratórios Médicos (PELM) da SBPC/ML e do *College of American Pathologists (CAP)* dos Estados Unidos da América.

Todos os parâmetros bioquímicos e hematológicos aplicados neste estudo apresentam desempenho satisfatório (acima de 80% acerto), nos dois programas de ensaio de proficiência citados.

3.8 TÉCNICA MOLECULAR

3.8.1. Metodologia utilizada no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

O DNA genômico foi obtido a partir de leucócitos de sangue periférico utilizando-se o Kit de extração da marca FlexiGene (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). As amostras foram submetidas à amplificação, originando um fragmento de 771 pares de bases, delimitado pelos iniciadores P1 (“*sense*”) e P5 (“*anti-sense*”), descritos por Kimura e colaboradores⁽⁸⁴⁾.

O fragmento engloba a região das principais mutações associadas ao fenótipo β -talassêmico descritas no Brasil, sendo elas: IVS-I-1, IVS-I-6, IVS-I-110 e *codon 39*^(39,40,52,53).

Para a extração do DNA, foram pipetados 750 μ L de Buffer FG1 em um tubo de centrifugação de 1,5mL, devidamente identificado, adicionaram-se 300 μ L de sangue total e homogeneizou-se o tubo por meio de inversão. Foram centrifugados por 20 segundos a 10.000g e descartou-se o sobrenadante, mantendo o tubo invertido em papel absorvente durante 2 minutos. Em seguida foram adicionados 150 μ L da mistura a 150 μ L de Buffer FG2 e 1,5 μ L da solução de protease K. Misturou-se vigorosamente a solução final, utilizando-se um equipamento tipo “*vortex*”, até a completa homogeneização do material rico em DNA depositado no fundo do tubo (“*pellet*”). Os tubos foram incubados em termobloco por 5 minutos a 65°C e em seguida foram adicionados 150 μ L de isopropanol 100%, e realizou-se a homogeneização por inversão até visualização do precipitado contendo DNA.

Foram centrifugados por 3 minutos a 10.000g e descartou-se o sobrenadante, mantendo o tubo invertido em papel absorvente por 2 minutos, após foram adicionados 150µL de etanol e misturados vigorosamente por 5 segundos com auxílio de um misturador tipo “*vórtex*”. Seguiu-se centrifugação por 3 minutos a 10.000g e foi descartado o sobrenadante, mantendo os tubos invertidos em papel absorvente por 5 minutos, procedeu-se a secagem dos tubos à temperatura ambiente, até a total evaporação total do etanol.

Foram adicionados 200µL de Buffer FG3, e misturou-se vigorosamente por 5 segundos em seguida as amostras foram incubadas em termobloco por 10 minutos a 65°C. Finalizada a extração, as amostras foram congeladas a -20°C, para posterior realização da reação de PCR.

O protocolo da reação de PCR foi composto de: Tampão de PCR 1X; 0,2mM dNTPs; MgCl₂ 3,0mM; 200nM do “*primer*” senso P1 (5'-CCTAAGCCAGTGCCAGAAG-3'); 200nM do “*primer*” anti senso P5 (5'-TCATTGGTCTGTTTCCCATTG-3'); 1,25U de “*Taq Polymerase*” (Invitrogen® Carlsbad, Califórnia, U.S.A.) e 200ng de DNA genômico. As condições de ciclagem foram: 96°C 4 minutos, seguido de 40 ciclos a 96°C 30 segundos, 58°C 30 segundos, 72°C 1 minuto, com extensão final de 5 minutos a 72°C, realizadas em termociclador *Eppendorf* (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). O produto de PCR foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo 1% de brometo de etídeo e marcador de peso molecular (100bp DNA Ladder, Invitrogen® Carlsbad, Califórnia, U.S.A.), para verificar a amplificação do DNA das amostras.

O produto de PCR foi purificado para seguir o seqüenciamento, foi utilizado o kit para purificação *Microcon-100* (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Foram identificados tubos de centrifugação de 1,5mL e uma coluna *microcon A* seguir foram inseridas as colunas com a membrana para cima em cada tubo correspondente (microconcentrador) e pipetado 300µL de água deionizada juntamente com 50 µL do produto de PCR de cada amostra e centrifugou-se por 15 minutos a 550g. Após foram pipetados novamente 40 µL de água deionizada no centro de cada coluna e inverteram-se os microconcentradores em novos tubos devidamente identificados e seguiu-se a centrifugação por 10 minutos a 550g. Foram removidas e descartadas as colunas, restando as amostras nos tubos com volume final de 35 - 60 µL de produto de PCR purificado.

Após purificação foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo 0,5µg/mL de brometo de etídeo em tampão TAE (1X), para uma semi quantificação do produto amplificado para posterior seqüenciamento, utilizando como marcador (Low DNA Mass Ladder Gibco, Invitrogen® Carlsbad, Califórnia, U.S. A).

Cerca de 100ng de produto de PCR foi adicionado a um microtubo com 3,2 pmol de "*primer*", 2µL de "Mix Big Dye Terminator ready reaction" (Applied Biosystems Incorporation, Foster City, Califórnia, EUA), 4,4µL de "*save money*" (Tris-HCL 200mM (pH 9,0) e 5mM de MgCl₂). A extensão enzimática foi realizada em termociclador (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) durante 25 ciclos de 96°C por 10 segundos para denaturação do DNA molde, 50°C por 10 segundos, para anelamento do "*primer*" e 60°C por 4 minutos para a extensão.

O produto obtido foi novamente purificado, visando à remoção de excesso de dideoxynucleotídeos “terminadores” presentes na reação, através do método de precipitação com isopropanol a 75%, seguido de lavagem com etanol a 80%.

As amostras foram ressuspensas em *loading buffer* e seqüenciadas em gel de poliacrilamida (Long Ranger® Singer® Packs Cambrex Bio Science Rockland, ME, U.S.A.). Este método utiliza dideoxynucleotídeos marcados com substâncias fluorescentes diferentes para cada um deles (ddA, ddC, ddT, ddG), permitindo a leitura concomitante em um mesmo sensor do aparelho de seqüenciamento automatizado (ABI PRISM 377 – Applied Biosystems Incorporation, Foster City, Califórnia, EUA). As seqüências dos pacientes, uma seqüência do controle normal e uma seqüência do gene da β -globina obtida do “GeneBank” sob o número (DQ126304.1 GI:71727228) (anexo I) foram alinhadas no programa “*sequence navigator*” (Applied Biosystems Incorporation, Foster City, Califórnia, EUA). As seqüências foram editadas manualmente e as mutações foram rastreadas visualmente.

3.9 TESTES ESTATÍSTICOS

A análise estatística foi realizada no pacote estatístico SPSS versão 13.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA), e Microsoft Excel 2003 *for Windows* (Microsoft Corporation, Seattle, WA, USA).

Para responder os objetivos do estudo foram realizados testes de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov* para todos os exames laboratoriais.

Posteriormente, aplicou-se o teste *t-student* não pareado ⁽⁸⁵⁾. Para verificar o percentual de alteração genética foi utilizado o teste do sinal ⁽⁸⁶⁾.

Os dados foram ilustrados com o uso de gráficos *boxplot* ⁽⁸⁵⁾ e os testes foram realizados ao nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

4. RESULTADOS

A distribuição da origem étnica da população estudada, considerando até duas gerações anteriores está descrita na tabela 5. Para fins de classificação étnica foram considerados somente os ancestrais de origem comum. Nas situações em que se detectou uma diversidade na origem étnica, classificou-se como “não identificados”.

Os descendentes de italianos predominaram neste estudo, totalizando 45,0% da casuística, seguidos pelos portugueses com 10,0%. Uma parcela significativa da casuística (25,0%) não soube identificar a origem exata dos seus ancestrais.

Tabela 5-Distribuição da origem étnica da população com características hematológicas para β -talassemia.

| Origem | Freqüência | % |
|-------------------|-------------------|--------------|
| Itália | 18 | 45,0 |
| Portugal | 4 | 10,0 |
| Espanha | 2 | 5,0 |
| Síria | 2 | 5,0 |
| China | 1 | 2,5 |
| Alemanha | 1 | 2,5 |
| França | 1 | 2,5 |
| Holanda | 1 | 2,5 |
| Não identificados | 10 | 25,0 |
| Total | 40 | 100,0 |

Os resultados obtidos nos 40 pacientes avaliados mostraram que a faixa etária situou-se entre 2 e 83 anos, com idade média de 45 ± 25 anos, sendo que o grupo masculino ($n=15$) apresentou média de idade de 53 ± 23 anos e o feminino ($n=25$), 42 ± 25 anos.

O teste de resistência osmótica foi realizado na amostra de sangue dos 40 pacientes avaliados. Em 38 pacientes (95,0%) o resultado foi positivo, ou seja, os eritrócitos apresentaram resistência osmótica aumentada.

A tabela 6 exibe os valores mínimos e máximos e a média dos índices hematimétricos de todos os pacientes. O VCM e o HCM mostraram uma média de $63,9 \pm 5,9$ fL e $20,4 \pm 1,9$ pg respectivamente, demonstrando acentuada microcitose e hipocrômia dos eritrócitos (VCM < 78 fl e HCM < 27 pg) para ambos os sexos, sem diferença estatística entre eles. Essa observação foi confirmada através da média dos resultados do RDW $17,9 \pm 0,23\%$, indicando a presença de anisocitose. Somente 5 (12,5%) pacientes apresentaram RDW abaixo de 16%. A grande maioria (87,5%) apresentou valores acima do referencial, que variaram de 16,2 a 20,4%.

A figura 4 mostra a presença de hemácias em alvo, microcíticas e hipocrômicas:

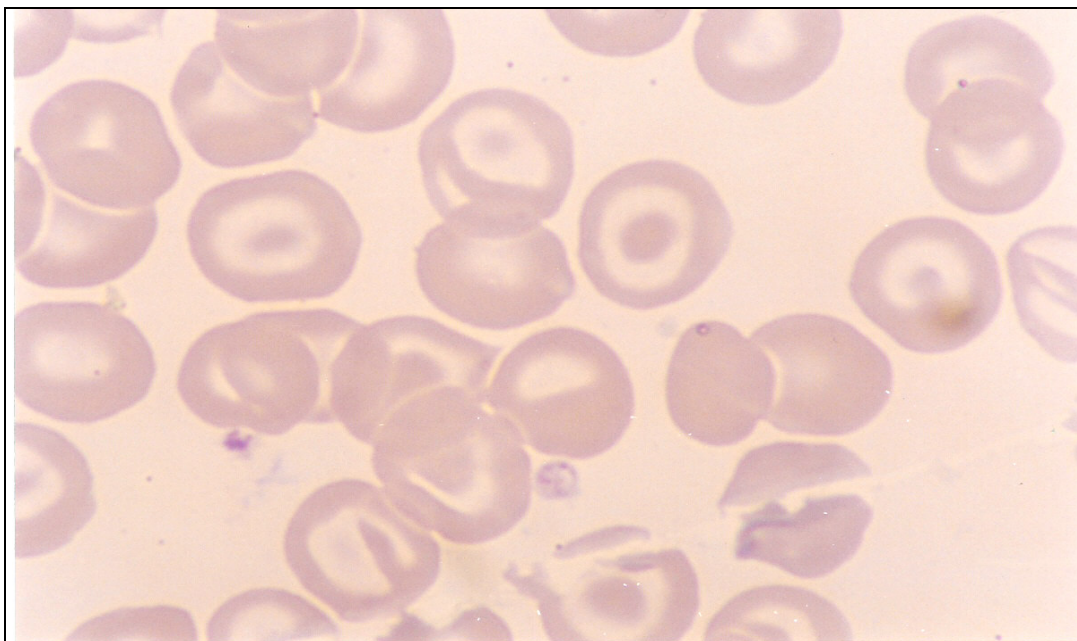


Figura 4 - Eritrócitos apresentando palidez central e acentuada microcitose. Índice hematimétrico: VCM de 64,2 fL e HCM de 20,2 pg.

Os valores dos índices hematimétricos e dos parâmetros bioquímicos estão apresentados sob a forma de gráficos *boxplot* ^(85,86). A análise estatística foi realizada com nível de significância de 5%. Não foi observada diferença significativa nos parâmetros avaliados entre os pacientes.

Tabela 6-Valores mínimos e máximos, média, desvio padrão e valores de referência dos parâmetros bioquímicos e hematológicos.

| Parâmetros bioquímicos e hematológicos | Valores mínimos e máximos | Média e desvio padrão | Valores de Referência | | |
|--|---------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------|--------------|
| | | | Crianças 6 meses–16 anos | Homens | Mulheres |
| Eritrócitos (milhões/mm ³) | 3,92 – 7,39 | 5,5±0,11 | 4,0 – 5,3 | 4.4-5.9 | 4.0-5.4 |
| Hb(g/dL) | 8,5 – 15,3 | 11,1±1.4 | 11,7 -14,4 | 13,0-18,0 | 12,0-16,0 |
| Hematócrito (%) | 27,5 – 47,3 | 34,9±4,04 | 34,0 – 43,0 | 0.40-0.52 | 0.35-0.47 |
| VCM (fL) | 54,4 – 71,8 | 63,5±0,78 | 75,0 -87,0 | 80,0-100,0 | 80,0-100,0 |
| HCM (pg) | 17,3 – 22,1 | 20,2±0,25 | 25,0 – 31,0 | 27,0-32,0 | 27,0-32,0 |
| CHCM (g/dL) | 29,8 – 33,6 | 31,8±0,12 | 33,0 – 35,0 | 32,0-37,0 | 32,0-37,0 |
| RDW CV (%) | 14,7 – 20,6 | 17,9±0,23 | 9,5 – 16,0 | 9,5 – 16,0 | 9,5 – 16,0 |
| RDW SD (fL) | 31,3– 44,6 | 38,7±0,83 | 34,0 – 54,0 | 34,0 – 54,0 | 34,0 – 54,0 |
| HbA ₂ (%) | 3,5 – 8,0 | 5,5±0,15 | 1,5 – 3,5 | 1,5 – 3,5 | 1,5 – 3,5 |
| HbA ₂ EL (%) | 3,5 - 7,9 | 5,5±0,13 | 1,5 – 3,5 | 1,5 – 3,5 | 1,5 – 3,5 |
| HbF (%) | 0,3 – 5,6 | 1,4±0,17 | 0,1 – 2,0 | 0,1 – 2,0 | 0,1 – 2,0 |
| Ferro (µg/dL) | 27,0 – 217,0 | 98,9±5,86 | 37,0 – 145,0 | 59,0 – 158,0 | 37,0 – 145,0 |
| Ferritina(ng/mL) | 5 - 1804 | 244,7 ± 324,92 | 20,0 - 200 | 30,0 - 400 | 15,0 - 150 |

Gráfico 1: Distribuição dos valores de **ferro sérico** nos pacientes com mutação genética para β -talassemia.

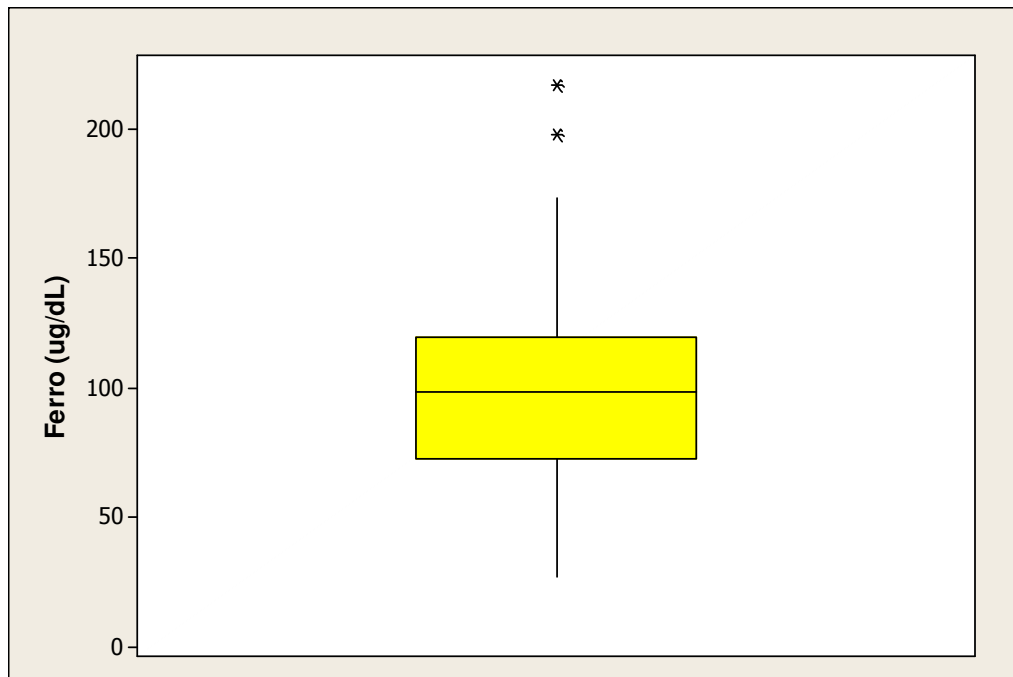


Gráfico 2: Distribuição dos valores de **ferritina sérica** nos pacientes com mutação genética para β -talassemia.

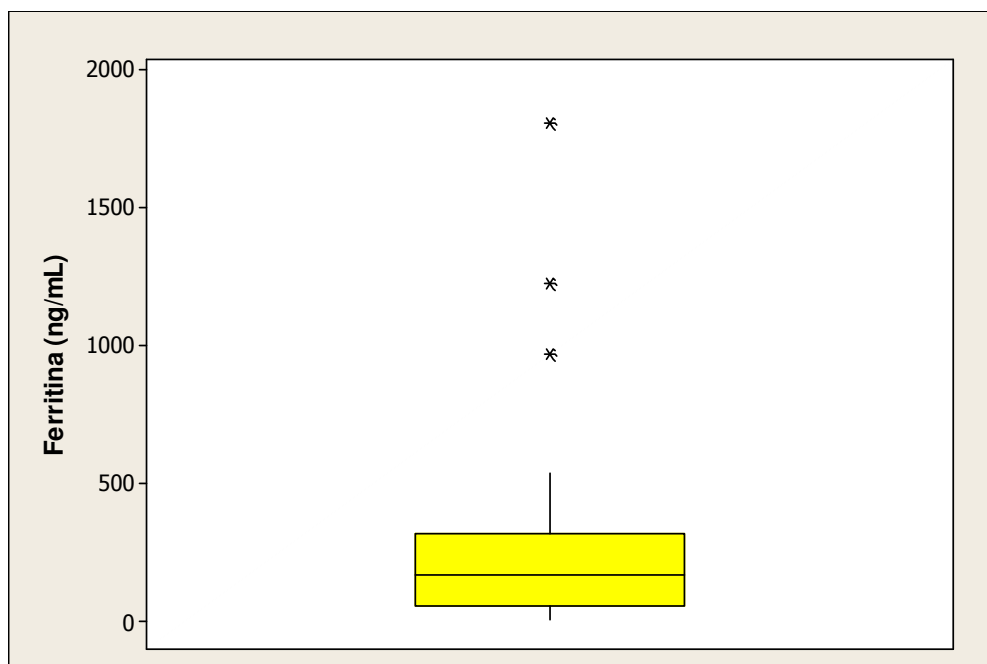


Gráfico 3: Distribuição dos valores de **hemoglobina fetal** nos pacientes com mutação genética para β -talassemia.

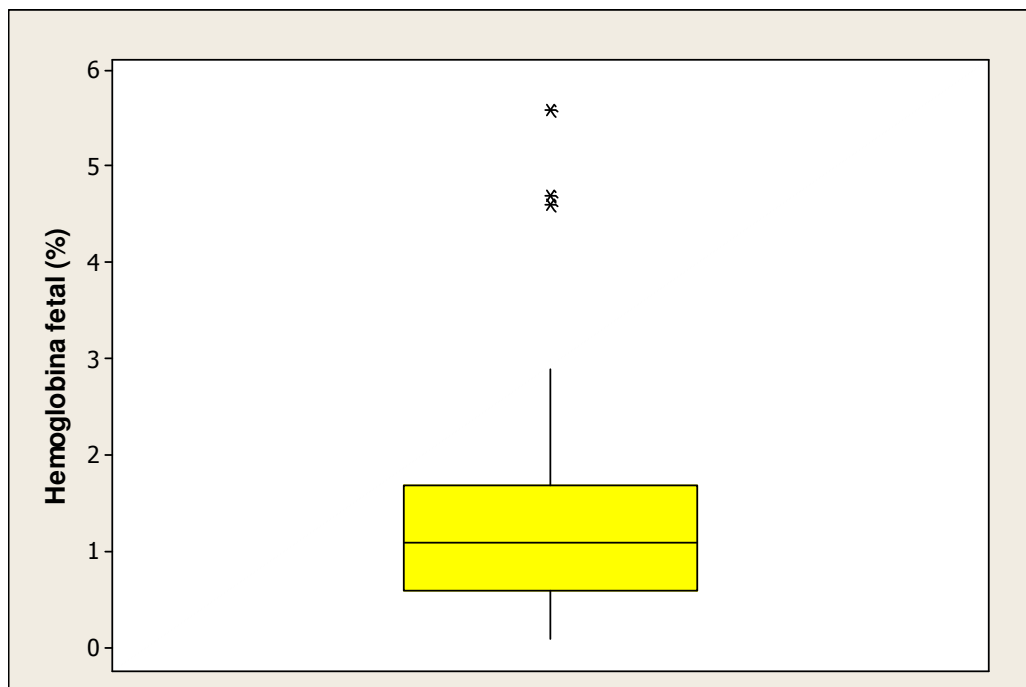


Gráfico 4: Distribuição dos percentuais de **hemoglobina A₂** por **HPLC** e **eletroforese em gel de agarose, pH alcalino**, nos pacientes com mutação para β -talassemia.

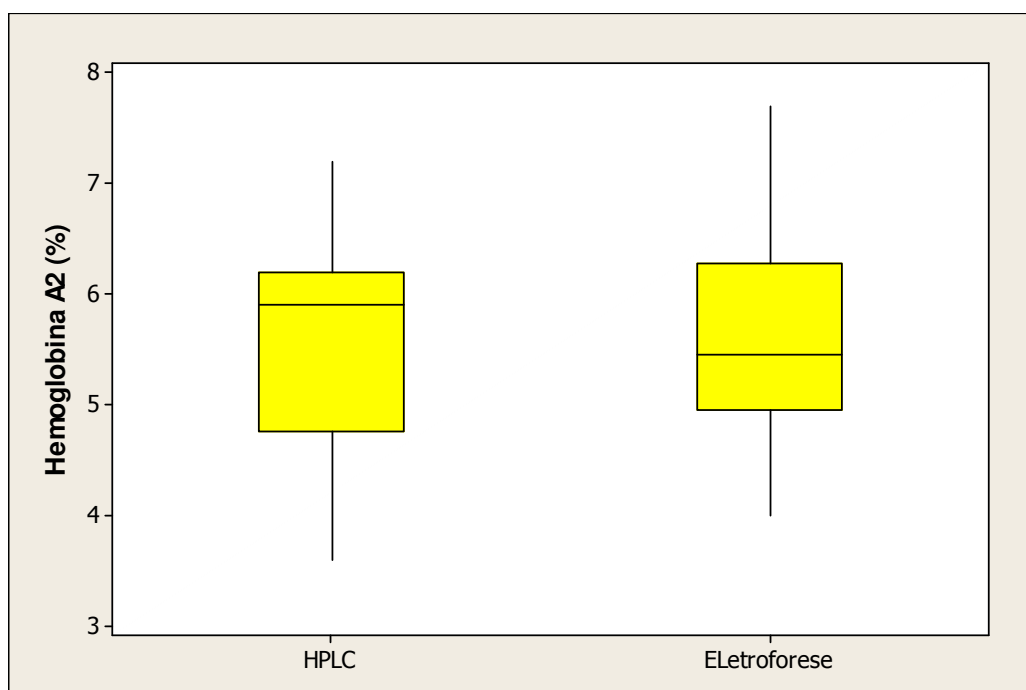


Gráfico 5: Distribuição dos valores de **eritrócitos** nos pacientes com mutação genética para β -talassemia.

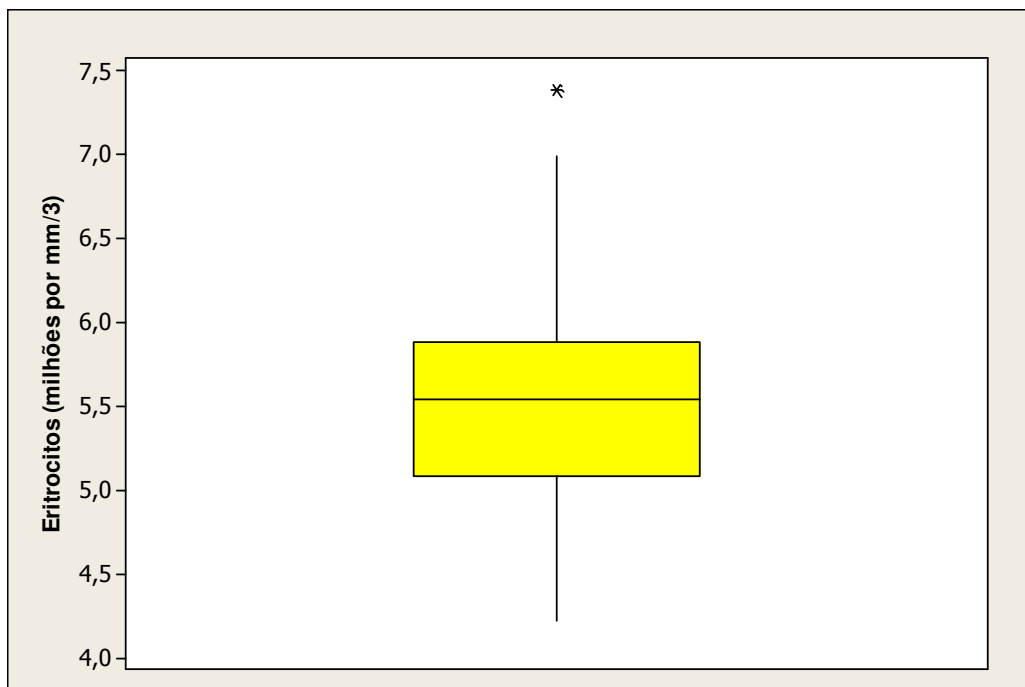


Gráfico 6: Distribuição dos valores de **hemoglobina** nos pacientes com mutação genética para β -talassemia.

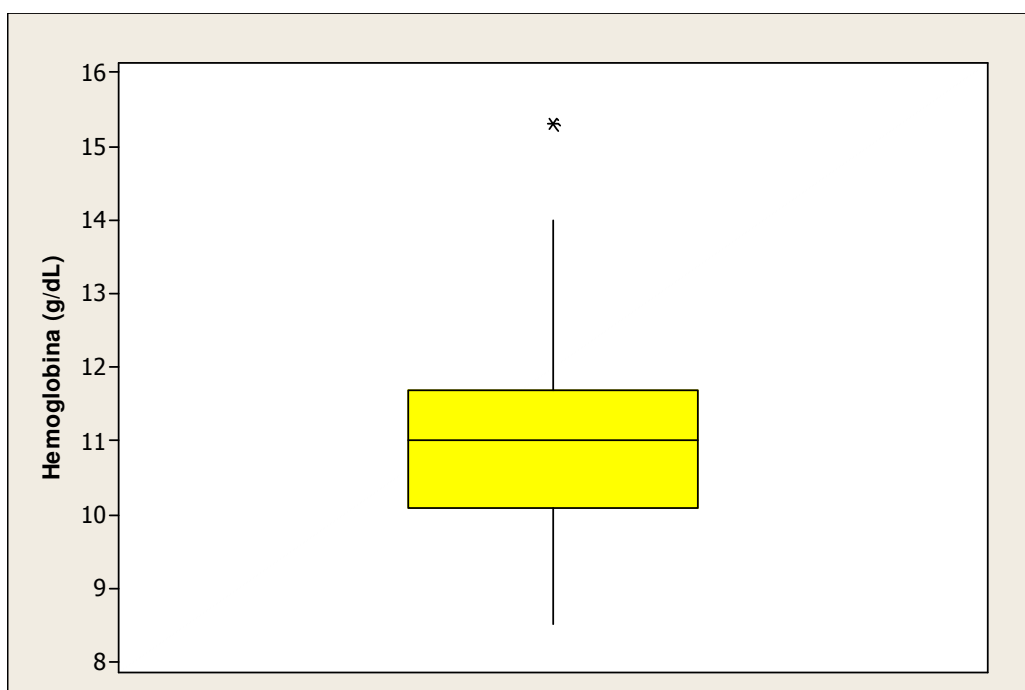


Gráfico 7: Distribuição dos valores de **hematócrito** nos pacientes com mutação genética para β -talassemia.

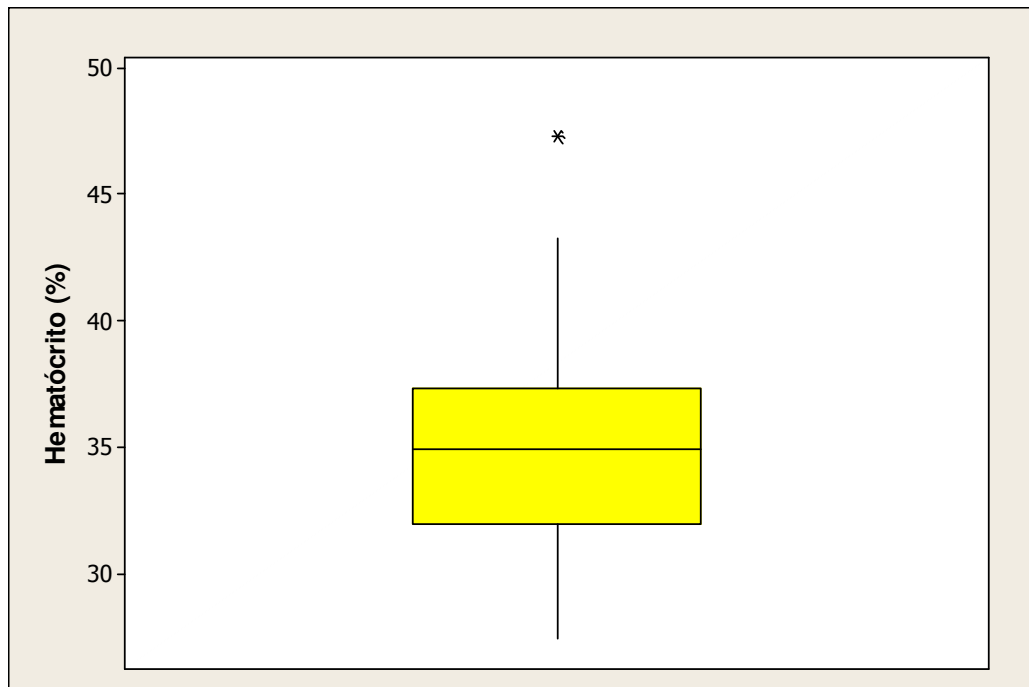


Gráfico 8: Distribuição dos valores de **VCM** nos pacientes com mutação genética para β -talassemia.

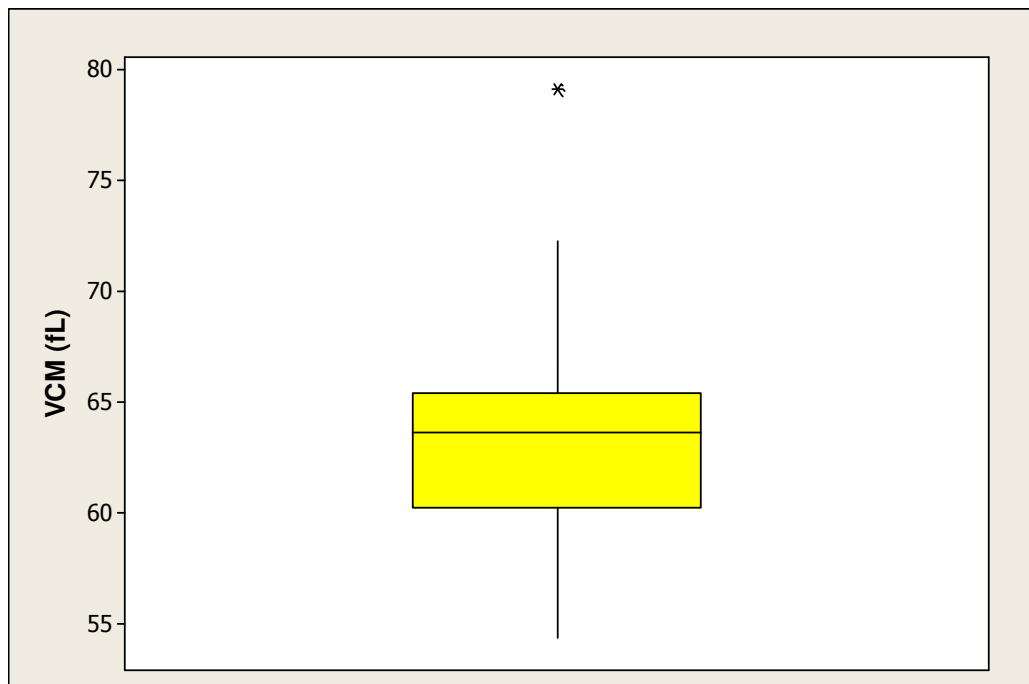


Gráfico 9: Distribuição dos valores de **HCM** nos pacientes com mutação genética para β -talassemia.

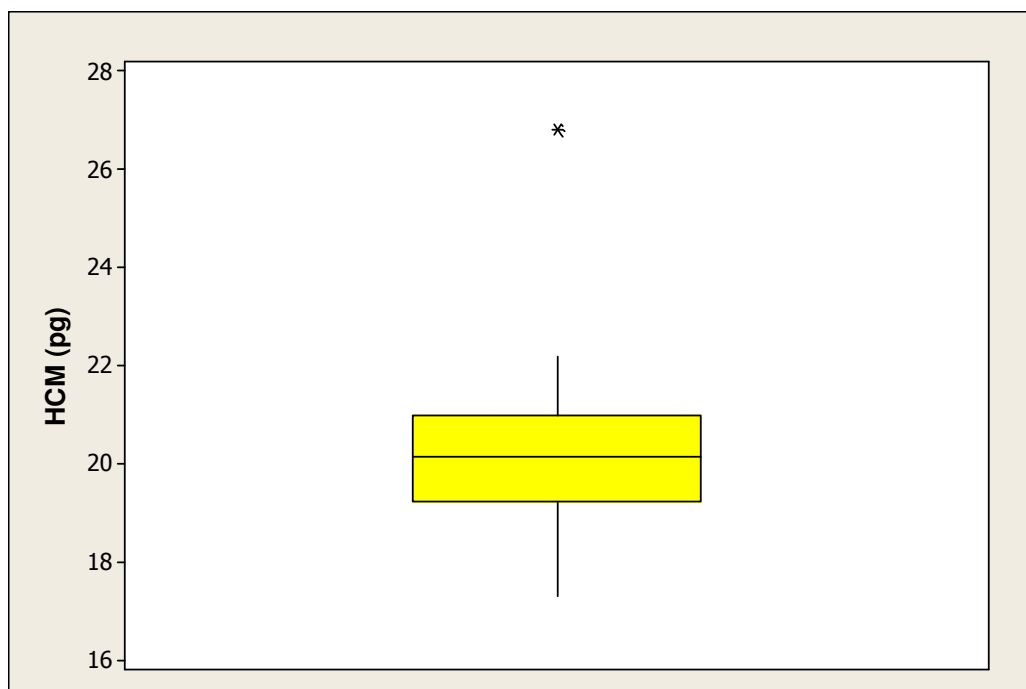


Gráfico 10: Distribuição dos valores de **CHCM** nos pacientes com mutação genética para β -talassemia.

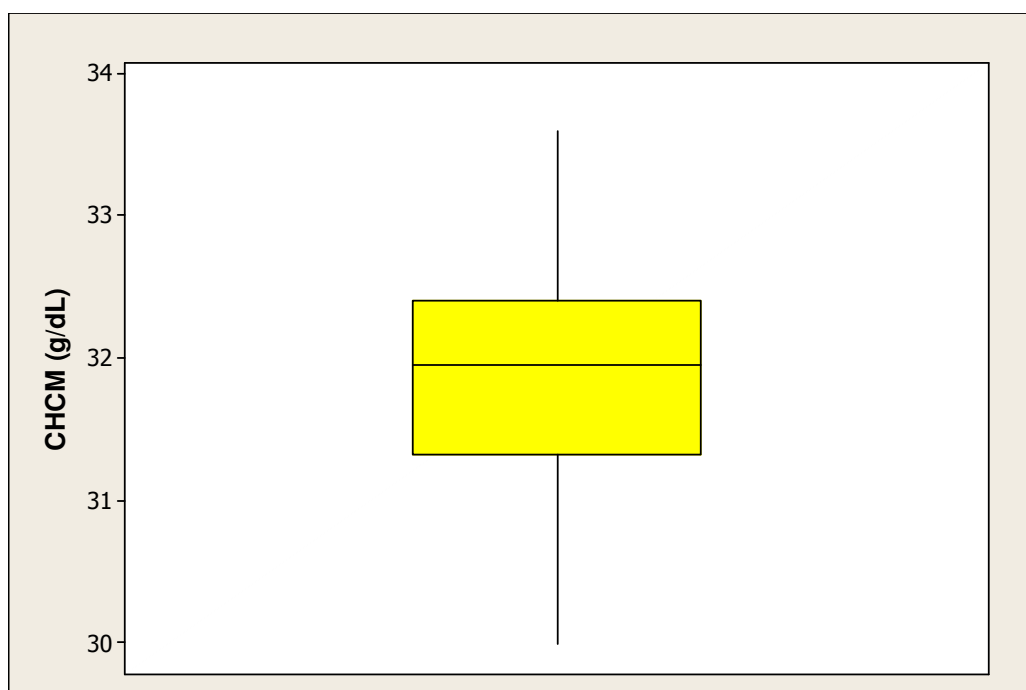


Gráfico 11: Distribuição dos valores de **RDW-CV** nos pacientes com mutação genética para β -talassemia.

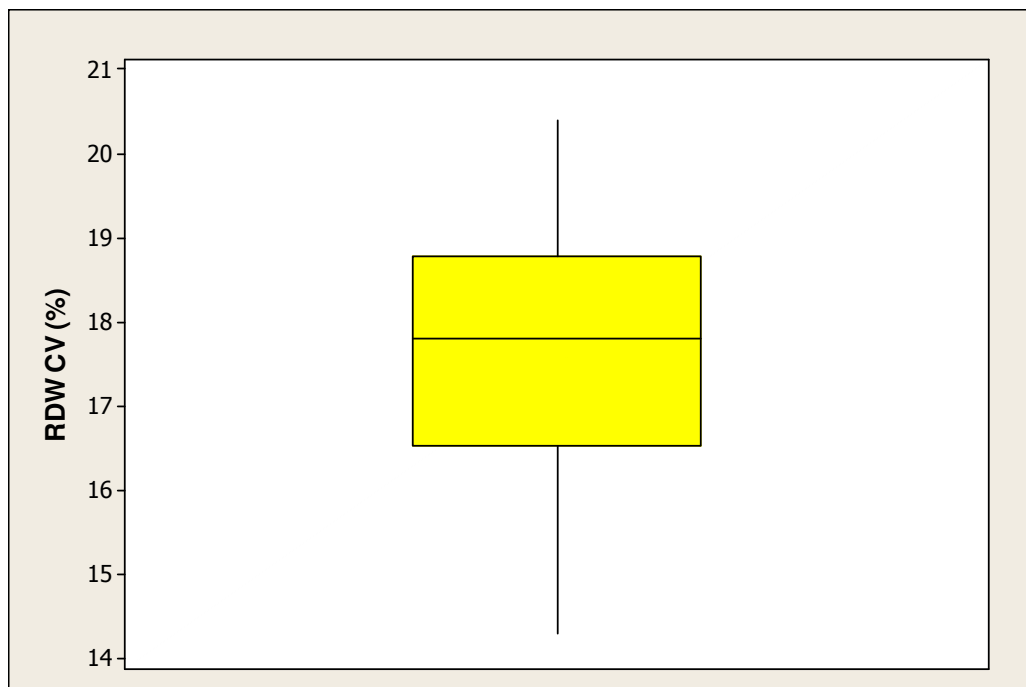
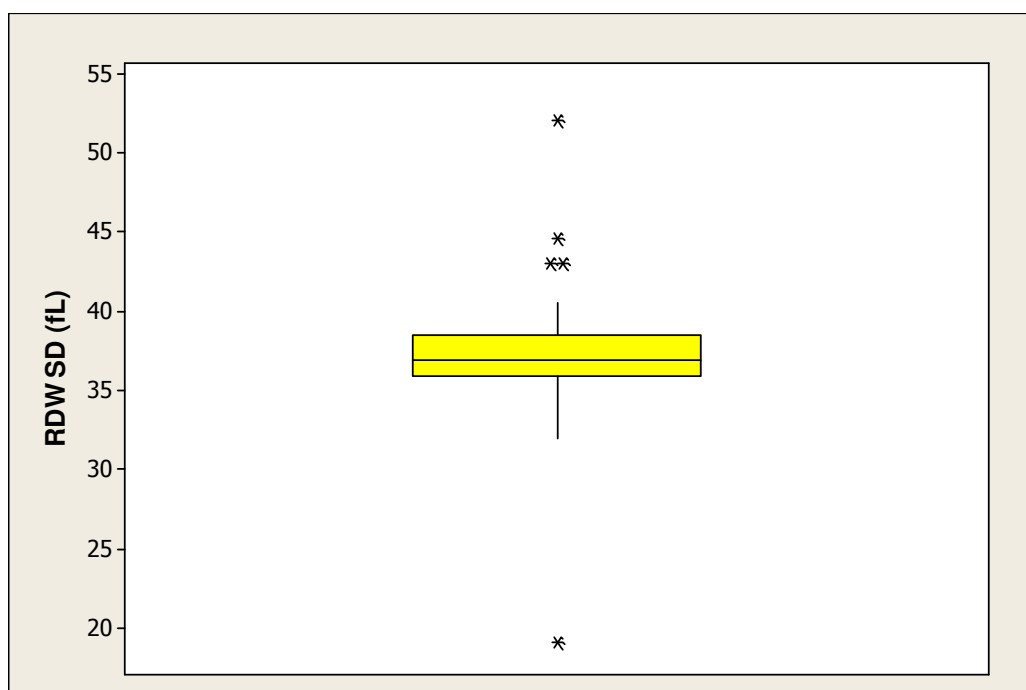


Gráfico 12: Distribuição dos valores de **RDW-SD** nos pacientes com mutação genética para β -talassemia.



Em nosso estudo, os percentuais de HbF e HbA₂ foram determinados pelo método eletroforético automatizado em gel de agarose, meio alcalino, e posteriormente confirmados pelo método de HPLC.

Os níveis de HbF variaram de 0,3% a 5,6% e a média percentual para todo o grupo foi de 1,4±0,17%. Para HbA₂ os valores variaram de 3,5% a 7,2% com média de 5,5±0,15%. Os valores observados neste estudo são concordantes com aqueles descritos na literatura para a triagem e diagnóstico da β -talassemia heterozigótica.

Os resultados obtidos pelos dois métodos demonstraram diferença significativa na dosagem dos níveis de HbA₂:

Tabela 7-Resultados de HbA₂ obtidos pelo método do HPLC e eletroforese em meio alcalino, em 40 pacientes portadores de mutação para β -talassemia.

| | HbA ₂ (%) por HPLC | HbA ₂ (%) por EFH |
|---------------|-------------------------------|------------------------------|
| Máximo | 7,2 | 6,8 |
| Mínimo | 3,5 | 3,5 |
| Média | 5,4 | 5,2 |
| Desvio padrão | 0,25 | 0,17 |

Os resultados de ferro e ferritina foram normais para a maioria dos pacientes, a média de valores para o ferro foi de 98,9±5,86 μ g/dL e para a ferritina foi de 244,7±324,92 ng/mL. O paciente nº12 (anexoll) apresentou concentração de ferritina e ferro abaixo dos valores de referência: 13ng/mL e 58 μ g/dL, respectivamente. O paciente nº 3 apresentou concentração de ferritina elevada 1226 ng/mL e a concentração de ferro baixo 41 μ g/dL, e o paciente nº 23 apresentou concentração de ferritina e ferro elevada 1804

ng/mL e 217 µg/dL respectivamente, situações características em pacientes com reposição de suplemento ferroso.

Após extração de DNA e reação de PCR, o produto foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo 1% de brometo de etídeo e marcador de peso molecular (100bp DNA Ladder, Invitrogen® Carlsbad, Califórnia, U.S.A.), onde se verificou a amplificação do DNA das amostras (Fig.3). Em seguida foi realizada reação de purificação e seqüenciamento que permitiu a identificação das mutações.

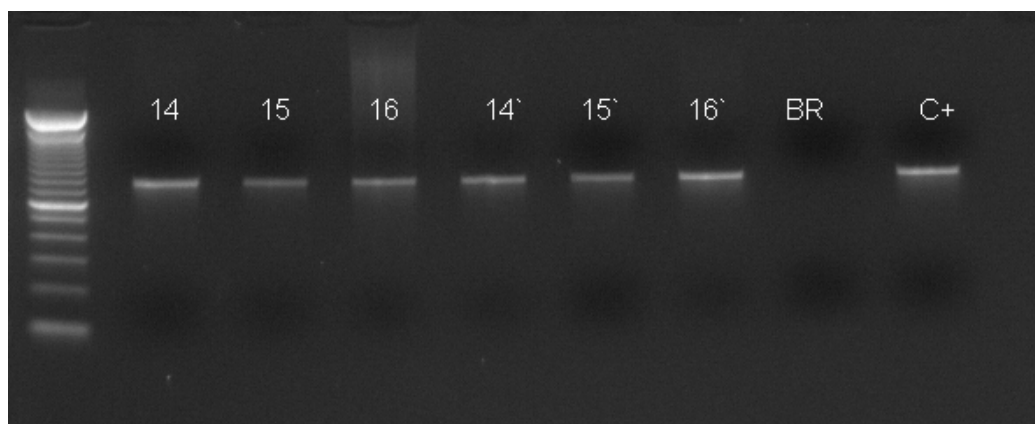


Figura 5-Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo 0,05 mg/mL. Controle negativo BR, controle positivo C+.

A primeira etapa do estudo molecular realizado no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo revelou que dos 40 pacientes avaliados, 25 (62,5%) apresentavam a mutação para β -talassemia, 15 (37,5%) não apresentaram defeito molecular na região gênica avaliada.

Diante do elevado percentual de negatividade, decidiu-se pela repetição da análise molecular das 15 amostras nas quais não haviam sido

encontradas mutações, agora no Laboratório de Hemoglobina e Genoma - Hemocentro II – UNICAMP.

A tabela 8 mostra o genótipo, a freqüência e distribuição das mutações observadas após a segunda avaliação.

Tabela 8-Freqüência e distribuição das mutações observadas para β -talassemia

| Mutação | Freqüência | % |
|-----------------------------|------------|------------|
| <i>Codon 39 (C→T)</i> | 20 | 50 |
| <i>IVS-I-110 (G→A)</i> | 6 | 15 |
| <i>IVS-I-1(G→A)</i> | 4 | 10 |
| <i>IVS-I-5 (G→C)</i> | 3 | 7,5 |
| <i>IVS-I-6 (T→C)</i> | 1 | 2,5 |
| <i>Del C Cd 44</i> | 1 | 2,5 |
| <i>Stop Cd 6 (G→T)</i> | 1 | 2,5 |
| <i>Stop Cd15 (G→A)</i> | 1 | 2,5 |
| <i>IVS-I –Exon-II (G→A)</i> | 1 | 2,5 |
| <i>Exon II-IVS II (G→A)</i> | 1 | 2,5 |
| <i>5'UTR+20</i> | 1 | 2,5 |
| Total | 40 | 100 |

As mutações observadas na população avaliada, em ordem crescente de freqüência foram: *Codon 39 (C→T)*, *IVS-I-110 (G→A)*, *IVS-I-1(G→A)*, *IVS-I-5 (G→C)*, *IVS-I-6 (T→C)*, *IVS-I-Exon-II (G→A)*, *Exon-II-IVS-II (G→A)*, *Stop Cd 6 (G→T)*, *Stop Cd15 (G→A)*, *Del C Cd 44* e *5'UTR+20*. Os primeiros quatro genótipos representaram 82,5% das mutações observadas neste trabalho. A mutação portuguesa *IVS-I-6 (T→C)*, foi encontrada somente em um paciente, assim como *stop Cd15 (G→A)*, *Del C Cd 44* e *5'UTR+20*. A paciente nº 37, (anexoII) apresentou um *stop codon 6 (G→T)*. Esta rara alteração genética foi descrita pela primeira vez no Brasil por Grignoli e colaboradores⁽⁸⁶⁾. Nesta condição observa-se a geração de um código de parada, cuja manifestação fenotípica é um quadro de β^0 -

talassemia. Em nosso estudo foi encontrada uma deleção (C) no *codon* 44 no paciente nº 35 este tipo de mutação é pouco comum para β - talassemia.

As figuras 6, 7 e 8 mostram as reações de seqüenciamento com a presença das mutações: *codon* 39 (C→T) presente no *exon* II, IVS-I-110 (G→A) e *stop codon* 6 (G→T) no *exon* I, respectivamente.

As seqüências das amostras que foram analisadas neste estudo foram submetidas ao *GenBank* sob os números EU760920 - EU760960.

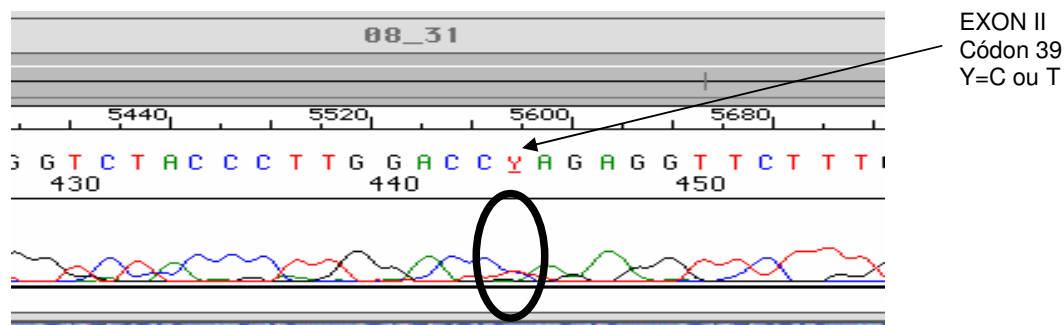


Figura 6-Seqüenciamento mutação *códon* 39 (C→T)

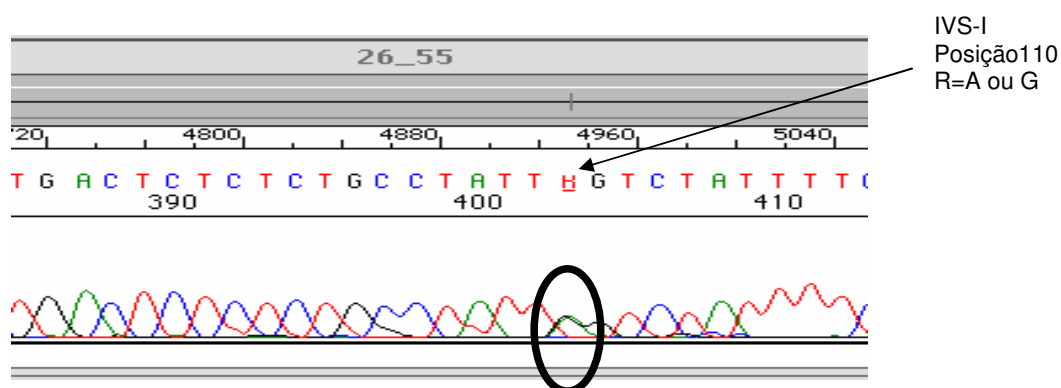


Figura 7-Seqüenciamento mutação IVS-I-110 (G→A)

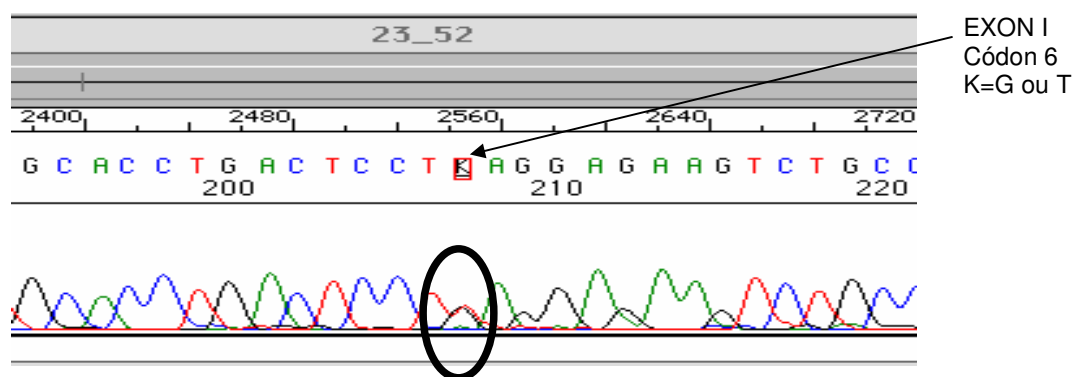


Figura 8 - Seqüenciamento mutação *códon* 6 (G→T).

5 DISCUSSÃO

As talassemias constituem as desordens monogênicas de maior frequência na população mundial, sendo que a doença mostra uma grande diversidade genotípica e fenotípica ^(88,89).

A população brasileira é caracterizada por um alto grau de miscigenação, fato que pressupõe um grande polimorfismo genético. Como consequência, a diversidade fenotípica da talassemia é esperada, devido a diferentes chances de associações genotípicas na população ⁽⁹⁰⁾.

A β -talassemia possui importância regional em virtude de sua alta frequência entre os descendentes italianos ^(1,57,91,92).

Neste trabalho foi observada uma predominância de descendentes italianos (45,0%) seguida dos portugueses (10,0%). O elevado grau de miscigenação da população brasileira é uma realidade, haja vista um percentual significativo de pacientes que não souberam determinar a sua origem étnica (25,0%).

A estratégia para identificação dos indivíduos heterozigotos foi baseada no fato de que, embora livres de sintomas clínicos, estes pacientes apresentam características hematológicas e bioquímicas específicas utilizadas para sua identificação. O diagnóstico definitivo requer a análise molecular e o melhor teste só poderá ser selecionado após as dosagens exatas dos índices hematológicos, em particular HCM, VCM e estimativa dos valores de HbA₂ e HbF ^(46,12).

Os valores que indicam a possibilidade de heterozigose para β -talassemia incluem VCM menor que 78 fL e HCM inferior a 27 μ g. No entanto, o parâmetro mais confiável seria o HCM, visto que as amostras

estocadas por mais de 24 horas podem induzir elevação do VCM em até 5 fL. A maioria dos pacientes heterozigotos para β -talassemia, seja β^0 ou β^+ , produz hemácias hipocrômicas (HCM de 19 a 23 pg) e microcíticas (VCM de 62 a 78 fL), além da elevação dos valores de HbA₂ num intervalo de 4,0 a 5,5%. O aumento dos níveis de HbF é variável, porém a maioria dos pacientes heterozigotos apresentam níveis que variam de 2,5 a 3,0% ⁽⁹³⁾.

Os níveis de HCM e HbA₂ podem ser influenciados por outros fatores, como, por exemplo, na co-herança com a α -talassemia, em que se observam valores normais para o HCM e HbA₂. Uma alta freqüência de interação α e β talassemia tem sido observada em alguns países do mediterrâneo, no médio e extremo oriente ⁽⁴⁶⁾. Considerando que no Brasil existe um grande contingente de imigrantes oriundos dos países do mediterrâneo, é importante associar a pesquisa de mutações para α -talassemia nos portadores de β -talassemia ^(84,89).

Para fins de avaliação inicial utilizamos os dois parâmetros hematimétricos. Todos os pacientes apresentaram VCM abaixo de 78 fL, e HCM inferior a 27 pg, sendo que as amostras foram analisadas no intervalo máximo de 3 horas após a coleta.

A nova geração de equipamentos analisadores hematológicos automatizados permitiu a avaliação do grau de anisocitose por um índice denominado *red cell distribution width* (RDW). O RDW é uma medida que permite avaliar o grau de variação na forma das hemácias.

Algumas formas de anemia microcítica, mais notadamente a anemia ferropriva, são caracterizadas pela elevação do RDW. Já as talassemias

produzem uma população de hemácias microcíticas, uniformes, sem uma elevação significativa do RDW. No entanto o RDW não deve ser utilizado como parâmetro isolado, mas como uma informação complementar aos outros índices hematimétricos ⁽¹²⁾.

O valor médio do RDW observado nos pacientes deste estudo foi de $17,9 \pm 0,23\%$ (valor de referência: 9,5% a 16,0%), fato que demonstra a presença de anisocitose nas amostras avaliadas. A grande maioria dos pacientes (87,5%) apresentou valores acima do referencial, variando de 16,2 a 20,6%. O estudo morfológico confirmou a presença da anisocitose na maioria das amostras avaliadas.

A dosagem de HbA₂ representa um dado extremamente valioso na diferenciação da anemia ferropriva e talassemia beta-heterozigótica. Na eventualidade da concomitância da talassemia beta-heterozigótica e anemia ferropriva a dosagem de HbA₂ poderia estar artificialmente reduzida ⁽⁹⁴⁾.

Todos os pacientes inclusos nesta casuística apresentaram percentual de HbA₂ maior ou igual a 3,5%, indicando possível talassemia. Os valores de HbF variaram dentro do intervalo descrito na literatura, demonstrando ser este mais um dado relevante a ser associado no diagnóstico da β -talassemia heterozigótica.

O método do HPLC foi utilizado para confirmação dos valores de HbA₂ e HbF, previamente determinados pelo método da eletroforese em gel de agarose em meio alcalino. O HPLC mostrou-se superior ao método eletroforético em função da possibilidade de quantificar com maior exatidão o nível de HbA₂

A maioria dos pacientes apresentou níveis séricos de ferro e ferritina dentro do intervalo de referência, afastando eventual diagnóstico de anemia ferropriva. No entanto, o paciente nº12 (anexoII) apresentou concentração de ferritina e ferro baixos: 13ng/mL e 58 µg/dL, respectivamente, porém o valor da hemoglobina foi de 15,3 g/dL, e os valores de HbA₂ tanto em eletroforese como no HPLC estava acima dos valores de referência 5,3 e 6,0% respectivamente. A mutação encontrada neste paciente foi IVS-I-1(G→A), que é uma alteração dentro de uma *Splice Junctions* impedindo o RNA *Splicing* normal, resultando em fenótipo de β^o - talassemia.

O paciente nº 3 apresentou concentração de ferritina elevada de 1226 ng/mL, concentração de ferro baixo de 41 µg/dL, nº de eritrócitos de 5,33 milhões/mm³ e nível de hemoglobina de 10,5 g/dL. O paciente informou não fazer reposição de ferro. O paciente nº 23 é do sexo feminino e apresentou concentração de ferritina e ferro elevada 1804 ng/mL e 217 µg/dL respectivamente, eritrócitos de 4,22 milhões/mm³ e hemoglobina de 8,5 g/dL. A paciente referiu saber ser portadora de talassemia com história prévia de transfusão para correção da anemia. A alteração gênica encontrada nestes dois casos foi *stop códon 39 (CAG→TAG)*, mutação *nonsense* onde ocorre troca de bases de um *codon* que codifica um aminoácido para um *codon* que codifica uma terminação, impedindo a tradução correta do RNAm resultando em fenótipo de β^o-talassemia.

Esta mutação é comum em populações do Mediterrâneo e é a mais freqüentemente encontrada no Brasil ⁽⁸⁷⁾.

Outro paciente, nº 39 apresentou ferritina abaixo dos valores de referência, 28 ng/mL e o valor de ferro 114 µg/dL, eritrócitos de 5,86 milhões/mm³, hemoglobina de 11,1 g/dL, valores de HbA₂ de 3,6 e 4,0% em HPLC e eletroforese respectivamente; a mutação encontrada foi IVS-I-110 (G→A) que cria um novo local de *Splice* dentro do *intron*, é uma das formas mais comuns de β -talassemia na região mediterrânea, fazendo com que cerca de somente 10% dos *splicing* ocorram nos locais normais, resultando então em uma β^+ -talassemia severa.

A frequência de beta-talassêmicos heterozigotos em populações mistas dos estados de São Paulo e do Rio Grande do Sul, com 16 a 30% de negróides, é de 0,8 a 1,1%. A prevalência no Norte e Nordeste é provavelmente inferior, em virtude da maior proporção de negros e mulatos, que perfazem 72% da população do Nordeste ⁽²¹⁾.

As mutações são regionalmente específicas e novas mutações têm sido determinadas principalmente nas populações de risco para talassemia. A estratégia para identificar as mutações da β talassemia é baseada no conhecimento das mutações comuns e raras daquele grupo étnico. Muitas populações têm demonstrado possuir poucas mutações comuns juntamente com um grande e variável número de raras mutações ⁽⁴⁶⁾.

Atualmente, no Brasil, quase 200 milhões de habitantes estão distribuídos de maneira irregular por todo o país. Inicialmente predominavam os portugueses, negros e ameríndios. Entre 1870 e 1953, cerca de cinco milhões de europeus migraram para o Brasil, sendo que aproximadamente

dois milhões eram italianos, principalmente do sul da Itália, tendo a grande maioria se fixado no estado de São Paulo.

Dados obtidos em dois estudos realizados no sudeste do Brasil mostraram que o defeito molecular mais prevalente é a mutação *nonsense* no *codon* 39 (C→T), que origina a β^0 -talassemia^(39,40).

Dos 40 pacientes avaliados neste trabalho, todos apresentaram mutação para β -talassemia, destes, (50,0%) apresentaram a mutação *nonsense* no *codon* 39 (C→T) concordando com o descrito na literatura, 6 pacientes (15,0%) apresentaram a mutação IVS-I-110 (G→A), 4 pacientes (10,0%) a mutação IVS-I-1 (G→A) e 3 (7,5%) a IVS-I-5 (G→C).

A mutação portuguesa IVS-I-6 (T→C), que usualmente leva a um quadro clínico caracterizado como leve, provavelmente foi introduzida no Brasil pelos primeiros colonizadores portugueses foi encontrada em apenas um paciente neste estudo representando somente 2,5% das mutações encontradas no grupo avaliado, apesar de ser considerada a terceira mutação freqüente na região sudeste do Brasil⁽⁵³⁾. Dados de Araújo e colaboradores demonstram que essa mutação apresenta maior freqüência no nordeste (62,8%) em relação ao sudeste (18,6%).

O primeiro caso de uma mutação *nonsense* no *codon* 6 do gene da β -globina (G→T) foi relatado por Grignoli e colaboradores. Neste caso, a β -talassemia resultou da substituição do primeiro nucleotídeo na posição do sexto códon, trocando a tradução de um ácido glutâmico por um *stop codon* (GAG→TAG). Esta mutação origina uma β^0 -talassemia, pois há ausência completa da produção de cadeia beta. Neste estudo foi encontrada uma

paciente do sexo feminino, adulta (nº 37) portadora desta rara mutação. A grande maioria das mutações que levam a β - talassemia são pontuais, as deleções são eventos raros. Em nosso estudo foi encontrado um paciente com deleção (C) *codon 44* (nº 35), alteração que gera uma terminação prematura da transcrição denominada “*frameshift*” que interrompe a mensagem do gene no trajeto subsequente à mutação, resultando em β^0 - talassemia ^(40, 43,44,45).

Estes dados indicam que a população avaliada é caracterizada por uma miscigenação mais acentuada, fato que induz maior probabilidade a este tipo de alterações genéticas.

Os índices hematimétricos, valores bioquímicos e valores de HbA₂ das amostras avaliadas mostraram-se compatíveis com o perfil descrito na literatura para diagnóstico laboratorial da β -talassemia.

Entendemos que a heterogeneidade clínica da β -talassemia é resultante das muitas interações possíveis entre os numerosos e diferentes defeitos nos genes que codificam as cadeias globínicas. Essas interações podem aumentar ou diminuir a severidade de manifestações clínicas da doença e ainda dificultar o diagnóstico laboratorial.

Em relação ao método laboratorial para análise do DNA baseado na reação em cadeia da polimerase e posterior seqüenciamento, demonstrou ser uma metodologia eficiente na identificação das mutações descritas como freqüentes para a população avaliada, assim como para a identificação de mutações raras e interações novas, refletindo a intensa miscigenação da população brasileira e ressaltando a importância da utilização de testes

complementares com boa resolução no diagnóstico das hemoglobinas, em especial nos casos de interações, fornecendo informações importantes para a conduta terapêutica e orientação genética ⁽⁹⁵⁾.

6. CONCLUSÕES

1. O uso combinado dos índices hematimétricos, parâmetros bioquímicos e avaliação das características morfológicas das hemácias demonstraram ser eficiente no rastreamento de pacientes portadores de β -talassemia heterozigótica.
2. A frequência da maioria das mutações encontradas é concordante com aqueles descritos na literatura.
3. Mutações raras para β -talassemia foram encontradas na população avaliada, demonstrando que novas alterações genéticas estão surgindo devido ao elevado grau de miscigenação da população brasileira.
4. Em relação às metodologias laboratoriais:
 - O método do HPLC mostrou ser superior a eletroforese em gel de agarose na caracterização do perfil de hemoglobinas.
 - A técnica do PCR e posterior processo de seqüenciamento demonstraram elevada eficiência na determinação das alterações moleculares no grupo de pacientes avaliados.

7. ANEXOS

1 ggtatggggc caagagatat atcttagagg gagggctgag ggtttgaagt ccaactccta
 61 agccagtgcc agaagagcca aggacaggta cggctgtcat cacttagacc tcaccctgtg
 121 gagccatacc ctagggttgg ccaatctact cccaggagca gggagggcag gagccagggc
 181 tgggcataaa agtcagggca gagccatcta ttgcttacat ttgcttctga cacaactgtg
 241 ttactagca acctcaaaca gacaccatg tgcacctgac tcctgaggag aagtctgccg
 301 ttactgccct gtggggcaag gtgaacgtgg atgaagtgg tggtgaggcc ctgggcaggt
 361 tggatcaag gttacaagac aggtttaagg agaccaatag aaactgggca tgtggagaca
 421 gagaagactc ttgggtttct gataggcact gactctctct gcctattggt ctatttccc
 481 acccttaggc tgctgggtgg ctacccttgg acccagaggt tctttgagtc ctttggggat
 541 ctgtccactc ctgatgctgt tatgggcaac cctaaggtga aggctcatgg caagaaagtg
 601 ctcggtgcct ttagtgatgg cctggctcac ctggacaacc tcaagggcac ctttgccaca
 661 ctgagtgagc tgcactgtga caagctgcac gtggatcctg agaacttcag ggtgagtcta
 721 tgggaccctt gatgttttct ttccccttct tttctatggt taagttcatg tcataggaag
 781 gggagaagta acaggggtaca gtttagaatg ggaacagac gaatgattgc atcagtggtg

ANEXO I – Seqüência DNA do gene normal da cadeia beta da globina (DQ126304.1). Em vermelho a região de anelamento do iniciador P1, em verde a região de anelamento do iniciador P5 e em azul o códon de iniciação. Assinalados com a cor púrpura estão os principais pontos de mutação resultando beta-talassemia encontrados na população brasileira, segundo estudos anteriores ^(38, 53,84).

| Nº | Ferro (µg/dL) | Ferritina (ng/mL) | HbF (%) | HbA2 (%) | HbA ₂ EL (%) | Eritrócitos (m./mm ³) | HbT (g/dL) | Hemat. (%) | VCM (fL) | HCM (pg) | CHCM (g/dL) | RDW- CV (%) | RDW- SD (fL) | Mutações |
|----|------------------|----------------------|------------|-------------|-------------------------------|--------------------------------------|---------------|---------------|-------------|-------------|----------------|----------------|-----------------|------------------|
| 1 | 108 | 74 | 2,0 | 5,8 | 5,2 | 6,42 | 13,1 | 40,5 | 63,1 | 20,4 | 32,3 | 18,6 | 38,2 | 5'UTR+20 |
| 2 | 142 | 486 | 1,7 | 6,6 | 5,8 | 5,41 | 10,3 | 32,5 | 60,1 | 19,0 | 31,7 | 18,8 | 35,6 | Cd39 (C→T) |
| 3 | 41 | 1226 | 2,6 | 6,2 | 4,9 | 5,33 | 10,5 | 33,1 | 62,1 | 19,7 | 31,7 | 19,0 | 39,1 | Cd39 (C→T) |
| 4 | 113 | 49 | 0,7 | 6,5 | 6,3 | 6,99 | 14,0 | 43,3 | 61,9 | 20,0 | 32,3 | 19,3 | 38,7 | Cd39 (C→T) |
| 5 | 98 | 353 | 1,2 | 5,9 | 5,5 | 5,53 | 11,6 | 35,6 | 64,4 | 21,0 | 32,6 | 16,7 | 36,9 | Cd39 (C→T) |
| 6 | 130 | 84 | 0,6 | 6,3 | 6,3 | 5,77 | 11,6 | 35,6 | 61,7 | 20,1 | 32,6 | 18,1 | 37,6 | IVS-I-110 (G→A) |
| 7 | 58 | 164 | 0,9 | 6,0 | 5,6 | 4,93 | 10,0 | 31,9 | 64,7 | 20,3 | 31,3 | 17,2 | 39,7 | IVS-I-110 (G→A) |
| 8 | 105 | 220 | 4,6 | 6,4 | 6,6 | 4,35 | 8,8 | 27,7 | 63,7 | 20,2 | 31,8 | 19,7 | 40,6 | Cd39 (C→T) |
| 9 | 99 | 68 | 1,9 | 6,2 | 6,8 | 5,08 | 10,6 | 32,9 | 64,8 | 20,9 | 32,2 | 16,7 | 37,5 | Cd39 (C→T) |
| 10 | 97 | 235 | 0,6 | 6,2 | 5,4 | 6,39 | 13,3 | 41,1 | 64,3 | 20,8 | 32,4 | 18,7 | 37,8 | Cd39 (C→T) |
| 11 | 115 | 244 | 1,1 | 6,0 | 5,3 | 6,09 | 11,7 | 37,4 | 61,4 | 19,2 | 31,3 | 18,4 | 36,9 | IVS-I-/EXII(G→A) |
| 12 | 58 | 13 | 0,5 | 6,0 | 5,3 | 7,39 | 15,3 | 47,3 | 64,0 | 20,7 | 32,3 | 20,4 | 43,0 | IVS-I-1 (G→A) |
| 13 | 119 | 174 | 1,0 | 6,4 | 4,9 | 5,64 | 10,8 | 32,9 | 58,3 | 19,1 | 32,8 | 16,9 | 33,1 | IVS-I-1 (G→A) |
| 14 | 75 | 138 | 0,3 | 7,2 | 6,3 | 5,72 | 12,0 | 37,6 | 65,7 | 21,0 | 31,9 | 16,0 | 36,9 | Cd39 (C→T) |
| 15 | 127 | 539 | 0,6 | 5,2 | 5,5 | 5,86 | 11,4 | 36,5 | 62,3 | 19,5 | 31,2 | 17,7 | 36,7 | Cd39 (C→T) |
| 16 | 84 | 38 | 0,9 | 5,0 | 5,1 | 5,79 | 11,7 | 37,2 | 64,2 | 20,2 | 31,5 | 16,5 | 36,8 | IVSI-110 (G→A) |
| 17 | 78 | 360 | 0,1 | 4,9 | 4,2 | 6,4 | 11,5 | 35,9 | 56,1 | 18 | 32,0 | 20,3 | 37,0 | IVSI-I-1 (G→A) |
| 18 | 107 | 72 | 1,7 | 5,8 | 5,7 | 5,68 | 11,2 | 36,1 | 63,6 | 19,7 | 31,0 | 17,8 | 38,1 | Cd39 (C→T) |
| 19 | 74 | 59 | 0,5 | 5,6 | 5,3 | 6,17 | 12,0 | 37,4 | 60,6 | 19,4 | 32,1 | 15,1 | 32,7 | IVS-I-110 (G→A) |
| 20 | 198 | 511 | 0,7 | 6,3 | 6,3 | 5,33 | 11,2 | 35 | 65,7 | 21,0 | 32,0 | 16,0 | 37,3 | Cd39 (C→T) |
| 21 | 90 | 173 | 5,6 | 6,8 | 6,8 | 4,53 | 12,6 | 38,1 | 84,1 | 27,8 | 33,1 | 18,0 | 52,1 | Cd39 (C→T) |
| 22 | 164 | 60 | 1,6 | 6,2 | 6,7 | 5,57 | 11,6 | 36,0 | 64,6 | 20,8 | 32,2 | 15,9 | 36,8 | Cd39 (C→T) |

| Nº | Ferro (µg/dL) | Ferritina (ng/mL) | HbF (%) | HbA2 (%) | HbA ₂ EL (%) | Eritrócitos (m./mm ³) | HbT (g/dL) | Hemat. (%) | VCM (fL) | HCM (pg) | CHCM (g/dL) | RDW-CV (%) | RDW-SD (fL) | Mutações |
|----|---------------|-------------------|---------|----------|-------------------------|-----------------------------------|------------|------------|----------|----------|-------------|------------|-------------|-------------------|
| 23 | 217 | 1804 | 1,0 | 6,0 | 6,5 | 4,22 | 8,5 | 27,5 | 65,2 | 20,1 | 30,9 | 15,6 | 35,9 | Cd39 (C→T) |
| 24 | 67 | 39 | 4,7 | 5,9 | 4,8 | 5,70 | 10,9 | 33,3 | 58,4 | 19,1 | 32,7 | 19,1 | 37,1 | Cd39 (C→T) |
| 25 | 172 | 365 | 1,7 | 5,7 | 4,7 | 4,92 | 10,9 | 33,9 | 68,9 | 22,2 | 32,2 | 19,4 | 44,6 | Cd39 (C→T) |
| 26 | 35 | 44 | 1,0 | 4,5 | 4,8 | 4,66 | 10,0 | 31,7 | 68 | 21,5 | 31,5 | 15,7 | 37,7 | IVS-I-5 (G→C) |
| 27 | 27 | 158 | 0,1 | 4,3 | 4,7 | 6,75 | 12,7 | 40,0 | 59,3 | 18,8 | 31,8 | 19,5 | 36,9 | Cd39 (C→T) |
| 28 | 98 | 251 | 0,7 | 6,2 | 5,6 | 5,34 | 10,3 | 30,7 | 57,5 | 19,3 | 33,6 | 19,3 | 35,8 | EX-II-IVS-II G→A) |
| 29 | 114 | 322 | 0,1 | 4,7 | 4,5 | 5,16 | 10,3 | 34,3 | 66,5 | 20,0 | 30,0 | 16,2 | 37,6 | Cd39 (C→T) |
| 30 | 89 | 167 | 0,1 | 4,4 | 4,3 | 5,09 | 11,2 | 36,8 | 72,3 | 22,0 | 30,4 | 14,7 | 38,6 | IVS-I-6 (T→C) |
| 31 | 64 | 30 | 1,7 | 6,2 | 6,5 | 5,55 | 9,6 | 30,2 | 54,4 | 17,3 | 31,8 | 18,3 | 32,0 | IVS-I-5 (G→C) |
| 32 | 66 | 38 | 0,1 | 5,6 | 5,4 | 5,99 | 10,8 | 34,4 | 57,4 | 18,0 | 31,4 | 18,3 | 34,5 | IVS-I-5 (G→C) |
| 33 | 72 | 230 | 1,6 | 5,2 | 5,2 | 5,12 | 10,6 | 33 | 64,5 | 20,7 | 32,1 | 19,6 | 43,0 | Stop Cd15 (G→A) |
| 34 | 58 | 274 | 0,7 | 5,9 | 6,0 | 5,10 | 9,9 | 30,3 | 59,4 | 19,4 | 32,7 | 17,6 | 35,9 | Cd39 (C→T) |
| 35 | 173 | 973 | 1,1 | 5,6 | 5,7 | 5,41 | 10,9 | 34,4 | 63,6 | 20,1 | 31,7 | 16,6 | 36,5 | Del C Cd 44 |
| 36 | 150 | 226 | 0,1 | 4,2 | 6,0 | 4,37 | 9,1 | 27,6 | 63,2 | 20,8 | 33,0 | 18,3 | 38,6 | IVS-I-110 (G→A) |
| 37 | 120 | 532 | 2,1 | 3,6 | 5,6 | 4,47 | 9,5 | 29,3 | 65,5 | 21,3 | 32,4 | 18,5 | 39,2 | Stop Cd 6 (G→T) |
| 38 | 137 | 52 | 2,6 | 4,3 | 6,2 | 5,91 | 11,1 | 34,9 | 59,1 | 18,8 | 31,8 | 17,8 | 33,5 | IVS-I-1 (G→A) |
| 39 | 114 | 28 | 0,1 | 3,6 | 4,0 | 5,86 | 11,1 | 36,3 | 61,9 | 18,9 | 30,6 | 16,7 | 35,1 | IVS-I-110 (G→A) |
| 40 | 72 | 50 | 0,1 | 4,0 | 5,7 | 4,71 | 9,9 | 30,5 | 64,8 | 21,0 | 32,5 | 17,8 | 38,0 | Cd39 (C→T) |

ANEXO II – Resultados de todos os parâmetros obtidos nos pacientes avaliados. HbA₂ EL: Hemoglobina A₂ obtida por eletroforese em gel de agarose, pH alcalino.

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Ramalho AS. As hemoglobinopatias Hereditárias, Um Problema de saúde Pública no Brasil. Ribeirão Preto São Paulo: Sociedade Brasileira de genética; 1986; 2: 4- 6.
2. Award-Address WA. The Thalassmias:The Role of Molecular Genetics in na Evolving Global Health Problem: Am. J. Hum. Genet, 2004; 74:385-392.
3. Ho PJ, Thein S L. Gene regulation and deregulation: a β globin perspective: Blood Rev., 2000; 14: 78-93.
4. Bank A. Understanding globin regulation in β -thalassemia: it's as simple as $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ The J. of Clinical Investigation., 2005; 115(6):1470-1473.
5. Sodeman WA. Jr.; M.D.F.A.C.P. e Sodeman TM. M.D.F.C.A.P. F.A.C.P. Fisiologia Patológica de Sodeman - Mecanismos das doenças. 6^a ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1983; 632.
6. Vogel F, Motulsky AG. Genética Humana – Problemas e Abordagens. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000; 245 – 268.
7. Perutz MF. The hemoglobin molecule: The Scientific American. San Francisco; 1964; 211 :(5) 64-76.
8. Lukens JN. As Hemoglobinas Anormais: Princípios Gerais. In: Lee G R.; Bithell, Foerster T J; Athens J W. Wintrobe Hematologia Clinica. 1a ed. São Paulo: Manole; 1998; 1120 –1152.
9. Shaanan B.The structure of human oxyhaemoglobin at 2.1 Å resolution. J.of molecular biology; INIST-CNRS Elsevier, 1983; 171 :(1) 31-59.
10. Perutz MF. Structure and mechanism of haemoglobin: Oxford Journals; 1976; 32: (3) 195-208.
11. Thompson M.W, Mcinnes RR, Willard HF Genética Médica. 5a ed., Rio de janeiro: Guanabara Koogan; 1993 34 – 36; 169 – 185.

12. Clarke GM., Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: Review and Update. *Clinical Chemistry*, 2000; 46: (8)1284-1290.
13. Guidelines for investigation of the alpha and beta thalassaemia traits. The Thalassaemia Working Party of the BCSH General Haematology Task Force, *Journal of Clinical Pathology*, 1994; 47(4): 289–295.
14. Cooley TB, Lee PA. Series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes; *Trans. Am. Pediatr. Soc.*, 1925; 37: 29-30.
15. Linman JW. Hemolytic Anemias. In: *Hematology*, Linman, JW. (Editors) Physiologic, Pathophysiologic and Clinical Principles. MacMillan Publishing Company. Inc., New York, Chapter Five, 1975; 103-221.
16. Rietti F. Ittero emolitico primitivo. *Ferrara: Alti Accat. Sci. Med Nat.*, 1925; 2:14-19.
17. Greppi E. Ittero emolitico familiare con aumento della resistenza dei globuli. *Minerva Med.*, 1928; 8: 1-11.
18. Micheli P., Penati P., Momigliano LG. Ulteriori ricerche sulla anemia ipocromica splenomegalica com poichilocitosi. *Atti Soc. Ital. Ematol Haematol*, (Pavia)1935 16, Supl.1: 10 – 13.
19. Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassemias. *Nat Rev Genet*; 2001; 2: 245-255.
20. Weatherall DJ. Clegg JB. *The thalassemia syndromes*. 3^a ed. Oxford: Blackwell; 1981.
21. Zago MA. Hemoglobinopatias: prevalência e variabilidade. *Revista Paulista de Medicina* 1986; 104(6): 300-304.
22. Thein SL. Pathophysiology of β thalassemia – A guide to molecular therapies. *American Society of Hematology*, 2005; 31-36.

23. Stamatoyannopoulos G, Grosveld F. Hemoglobin Switching In: Stamatoyannopoulos G, Majerus P WP, Roger M.; Varmus H. (editors) The molecular Basis of Blood Diseases. 3^a ed. Philadelphia,:W.B. Saunders Company; 2003;135-182.
24. Higgs DR. Ham-Wasserman Lecture - Gene regulation in Hematopoiesis: New lessons from thalassemia. American Society of Hematology, 2004; 1-13.
25. Thein SL. Genetic insights into clinical diversity of β -thalassemia British Journal of Haematology, 2004; 124: 264-274.
26. Huisman THJ, Carver MFH, Baysal, EA Syllabus of thalassemia mutations. Atlanta, 1997; The Sickle Cell Anemia Foundation.
27. Collins FS, Weissman SM. The molecular genetics of human hemoglobin. Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol., 1984 31: 315-465.
28. Waye JS, Chui DHK. The alpha globin gene cluster: Genetics and disorders. Clin Invest Méd, 2001; 24(2):103-9.
29. Clark BE Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. Blackwell Publishing Ltda. Clin. Lab. Haematology, 2004; 26: 159-176.
30. Dimovisky AJ, Efremov DG, Jankovic L, Plaseska D, Juricic D. A β thalassemia due to a 1605 pb deletion of the 5' β globin gene region. Br. J. of Haematol. 1993; 85: 143.
31. Forget BG. Molecular mechanisms of beta thalassemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, eds. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2001; 252 –276.
32. Flint J, Harding RM, Boyce AJ, *et al.* The population genetics of haemoglobinopathies. In: Rodgers GP. ed. Sickle cell disease and thalassemia. London, Baillière Tindall; 1998; 11:1.

33. Muller RF, Young ID. Hemoglobin and the hemoglobinopathies. In: Miller RF, Young ID (eds). Emery's Elements of Medical Genetics 10th ed. London: Churchill Livingstone, 1998.
34. Gelehrter TD, Collins FS, Ginsburg D. Molecular Genetics of Human Disease: Hemoglobinopathies. In: Gelehrter TD, Collins FS, Ginsburg D. (eds). Principles of Medical Genetics 2nd ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1998.
35. Olivieri N F. The β - Thalassemias. New Engl. J. Méd.1999; 341: 99-109.
36. Orkin SH, Goff SC, and Hechtman RL. Mutation in an intervening sequence splice junction in man. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981; 78(8): 5041–5045.
37. Weatherall DJ. The thalassemias. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ. (eds) Williams Hematology 5th ed. New York, McGraw-Hill, 1995.
38. Fonseca SF, Kerbauy J, Escrivão C, Figueiredo MS, Cançado R., Arruda VR, *et al.* Genetic analysis of beta-thalassemia major and beta-thalassemia intermedia in Brazil. Hemoglobin, 1998; 22: 197-207.
39. Costa FF, Tavela MA, Zago MA. Molecular bases of beta thalassemia in Brazil. Blood, 1990; 76:58.
40. Martins CSB, Ramalho AS, Sonati MF, Gonçalves MS, Costa F F. Molecular characterization of beta thalassemia heterozygotes in Brazil. J. Med. Genet. 1993; 30: 797-798.
41. Lukens JN. Talassemias e Distúrbios Afins: Distúrbios Quantitativos da Síntese de Hemoglobina. In: Lee G.R, Bithell TC, Forester J, Athens J W, Lukens JN. (editores). Wintrobe Hematologia Clínica. 1^a ed. Ed. Manole, São Paulo, 1998, 1206 – 1255.
42. Kazazian HH, Stuart HO[†], Alexander F, MARKHAM[‡], Catherine R, et al. Quantitation of the close association between DNA haplotypes and specific β - Thalassemia mutations in Mediterreans. Nature, 1984; 310: 152.

43. R F Trecartin, S A Liebhaber, J C Chang, K Y Lee, Y W Kan, M Furbetta, *et al.* Beta zero thalassemia in Sardinia is caused by a nonsense mutation. *J Clin Invest.* 1981; 68(4): 1012–1017.
44. Chang JC, Kan YW. β^0 - Thalassemia, a nonsense mutation in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1979; 76: 2886-2889.
45. Orkin SH, Goff SC. Nonsense and Frameshift Mutations in β^0 -thalassemia detected in cloned β -globin genes. *The Journal Biol. Chemistry*, 1978; 256(19):9782-9784.
46. Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood Reviews.* 2003; 17: 43 -53.
47. Weatherall DJ. The Thalassemias. In: Stamatoyannopoulos G; Majerus P, Perlmutter W, Roger M, Varmus H. (editors) *The Molecular Basis of Blood Diseases.* 3^a ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company. 2003; 183-226.
48. Weatherall DJ, Clegg JB. Genetic Disorders of hemoglobin. *Semin. Hematology*, 1999; 36: 24-37.
49. Weatherall DJ, Clegg JB. Thalassemia A global public health problem. *Nature Med.* 1996; 3: 47.
50. Cao A, Saba L, Galanello R, and Rosatelli MC. Molecular diagnosis and carrier screening for beta thalassemia. *The Journal of the American Medical Association.* 1997; 278 (15):1273-1277
51. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ.* 2001; 79: 704-712.
52. Zago MA, Bottura C. Beta-Thalassemia in Brazil. *Brazilian Journal Med. Biol Res.* 1981; 14: 383-388.

53. Araújo AS, Silva WA, Leão SA, Bandeira FC, Petrou M., Modell B, *et al.* Different molecular pattern of β -Thalassemia mutations in northeast of Brazil, Hemoglobin. 2003; 27:211-217.
54. Zago MA, Costa FF. Hereditary haemoglobin disorders in Brazil. Roy Soc. Trop Med. Hyg. 1985; 79: 385-388.
55. Reis PRM, Araújo LMM, Mesquita MM, Castro FS. *et al.* Prevalência de hemoglobinopatias e talassemias em crianças de 6 meses a 7 anos de idade no laboratório escola do Departamento de Biomedicina. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2005; 37(1) 3 -5.
56. Viana-Baracioli LMS, Bonini CR. *et al.* Prevenção de hemoglobinopatias a partir do estudo em gestantes. Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia. 2001; 23 (1) 31-39.
57. Naoum PC, Bonini CR, Firmino AF, Castilho PA. *et al.* Hemoglobinas anormais no Brasil. Prevalência e distribuição geográfica. Revista Brasileira Patologia Clínica. 1987;(23) 68-78.
58. Silva RBP, Ramalho AS, Cassorla RMS. A anemia falciforme como problema de saúde pública no Brasil. Revista Saúde Pública. 1993; (27) 54-58.
59. Zago MA, Costa FF, Tone LG, Bottura C. *et al.* Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population. Journal Human Heredity. 1983; (33) 125-129.
60. Beiguelman B. Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. 2^a.ed. São Paulo 1995 SBG.
61. Ducatti RP, Teixeira AEA, Galão HA, Bonini CR *et al.* Investigação de hemoglobinopatias em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto. Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia. 2001; 23(1) 23-29.
62. Reis PRM, Araújo LMM, Mesquita MM, Castro FS. *et al.* A importância do diagnóstico precoce na prevenção das anemias hereditárias. Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia. 2006; 28 (2) 149-52.

63. Wagner SC, Silvestri MC, Bittar CM, *et al.* Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes em pacientes com anemia não-ferropênica. *Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia*. 2005; 27 (1) 37-42.
64. Rigoli L, Meo A, Miceli MR, Alessio K, Carus RA, Laosa MA *et al.* Molecular analysis of β -thalassaemia patients in a high incidence area of southern Italy. *International journal of Laboratory Hematology Blackwell Synergy*. 2001; 23 (6) 373-378.
65. Guideline – The Laboratory Diagnosis of Haemoglobinopathies. Working Party of the general Haematology Task Force of the BCSH. *Br. J. Haematol.* 1998; 101: 783-792.
66. Trent RJA. Review Article: Diagnosis of the Haemoglobinopathies. *Rev Clin Biochem*. 2006; (27) 27-38.
67. Melo MR, Purini MC, Cançado RD, Kooro F, Chiattoni CS. Uso de índices hematimétricos no diagnóstico diferencial de anemias microcíticas: Uma abordagem a ser adotada? *Ver. Assoc. Med. Bras.* 2002; (48) 3: 1-6.
68. Leoneli GG, Imperial RE, Marchi-Salvador DP. *et al.* Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnóstica. *Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia [online]*. 2000; 22 (3) 396-403.
69. England JM, Frase PM. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait by routine blood-count. *Lancet*. 1973; 1:449-452.
70. Green R, King R. A new red cell discriminant incorporating volume dispersion for differentiating iron deficiency anemia from thalassaemia minor. *Blood Cells* 1989; 15:481-495.
71. Lima CSP, Reis ARC, Grotto HZW, Saad STO, Costa FF. Comparison of red cell distribution width and a red cell discriminant function incorporating volume dispersion for distinguishing iron deficiency from beta thalassaemia trait in patients with microcytosis. *São Paulo Med Journal* 1996; 114:1265-1269.

72. Eldibany MM, Totonchi KF, Joseph NJ, Rhone D. Usefulness of certain red blood cell indices in diagnosing and differentiating thalassemia trait from iron-deficiency anemia. *American Journal Clinical Pathology* 1999; 111:676-682.
73. Sonati MF, Kimura EM, Grotto HZW, Gervasio SA., Costa FF. Hereditary Hemoglobinopathies in a Population from Southeast Brazil, *Hemoglobin*.1996; 20(2), 175-179.
74. Colombo B. and Martínez G. Haemoglobinopathies including Thalassaemia. Part 2 Tropical America. *Clinics in Haematology*. 1981; 10: 730-756.
75. .Freitas EM, Rocha FJ. Detection of beta-thalassemia heterozigotes among Caucasians from Porto Alegre,RS, Brazil. *Rev. Brasileira de Genética*. 1983; 6: 185-188.
76. Ramalho AS. Investigação genético-epidemiológica das talassemias beta e delta-beta no Estado de São Paulo. *Rev. Paulista de Medicina*. 1976; 88:68-71.
77. Araújo JT. Talassemia, evolução, fisiologia, fisioterapia, base molecular e Classificação. *Bol. Informativo. Real Soc. Esp. Benef. (Sanatório Espanhol)*. 1984; 81: 25.
78. Oliveira RAG, Neto AP. Anemias e Leucemias: Conceitos básicos e diagnósticos por técnicas laboratoriais. 1ª ed. Roca São Paulo 2004; 287-288.
79. Bunn FH, Forget BG. *Hemoglobin: Molecular, genetic and clinical aspects*. Philadelphia WB. Saunders Company. 1986; 425-427.
80. Jong G, Von Dijk IP, Van Eijk HG. The biology of transferrin. *Clin.Chim. Acta* 1990; 190: 1-46.
81. Siedel J, Wahlefeld AW, Ziegenhorn J. A new iron ferrozine reagent without deproteinization. *Clin. Chem*. 1984; 30: 975.

82. Williams WJ, Beutler E, Ersler AJ, Lichtman MA. Eds. Hematology, 4th Ed. New York: McGraw-Hill 1990.
83. Franco RS. Ferritin, In: Pesce AJ, Kaplan LA. Eds Methods in clinical chemistry St. Louis/Washington/Toronto: CV Mosby Company. 1987; 1240-1242.
84. Kimura EM, Grignoli CRE, Pinheiro VRP, Costa FF, and Sonati MF. Thalassemia intermedia as a result of heterozigoses for β^0 -thalassemia and $\alpha\alpha^{\text{anti-3.7}}/\text{aa}$ genotype in a Brazilian patient. Brazilian Journal Medical Biological Research. 2003; 36(6): 699-701.
85. Bussab WO, Morettin PA. Estatística Básica 4^a ed. Atual São Paulo. 1987; 321.
86. Conover WJ. Practical nonparametric statistics 2^a ed. Wiley New York. 1980; 493.
87. Grignoli CRE, Carvalho MH, Kimura EM, Sonati MF, Costa FF, Arruda VR, *et al.* β^0 -Thalassemia resulting from a novel mutation: $\beta^{66}/U \rightarrow \text{stop codon}$. European Journal of Haematology. 2000; 64: 137-138.
88. Angastiniotis M. and Modell B. Global epidemiology of hemoglobin disorders. Ann NY Acad Sci. 1998; 85: 251-269.
89. Wong C, Antonarakis ES, Goff SC, Orkin SH, Boehm CD, Kazazian JR. HH. On the origin and spread of β -thalassemia: Recurrent of four mutations in different ethnic groups. Genetics 1986; (83); 6529-6532.
90. Devlin TM. Manual de Bioquímica com correlações clinica. 5^a ed. São Paulo, ed. Edgard Blücher, 2003, 347-360.
91. Penchaszadeh V. Genetics services for hemoglobinopathies in Latin America. I; Joint Who/tif Meeting of Prevention and Control of Haemoglobinopathies, 1993; Abstracts, 5-7 Nicosia; World Health Organization.

92. Ramalho AS Magna LA, Paiva e Silva RB. A Portaria no 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro Scielo Brasil. 2003; 19 (4):1195-1199.
93. Weatherall DJ. Clegg JB. The thalassemia syndromes. 4^a ed. Oxford: Blackwell Science; 2001.
94. Sonati MF, Grotto HZW, Kimura EM, Costa FF. Diferenciação entre talassemia beta-heterozigótica e anemia ferropriva, Rev. Associação Med. Brasileira. 1993; 39(4): 221-223.
95. Bhardwa JU, Zhang YH, Lorey F, Mccabe LL, Mccabe ERB. Molecular Genetic Confirmatory Testing from Newborn Screening Samples for the Common African-American, Asian-Indian, Southeast Asian, and Chinese β -thalassemia Mutations; American Journal of Hematology. 2005; 78: 249-255.