

**BIBLIOTECA**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Universidade de São Paulo**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Curso de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Análises Clínicas

Detecção da  $\alpha$ -talassemia através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em uma população selecionada apresentando microcitose e hipocromia.

Cristina Strufaldi de Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de  
**MESTRE**

Orientador:  
Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata

São Paulo  
2000

DEDALUS - Acervo - CQ



30100002954

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

O48d Oliveira, Cristina Strufaldi de  
Detecção da  $\alpha$ -talassemia através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em uma população selecionada apresentando microcitose e hipocromia / Cristina Strufaldi de Oliveira. -- São Paulo, 2000.

71p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Hirata, Mário Hiroyuki

I. Diagnóstico de laboratório : Medicina 2. Hemoglobinopatia : Doença : Medicina I. T. II. Hirata, Mário Hiroyuki, orientador.

616.0756-9 CDD

**Cristina Strufaldi de Oliveira**

**Detecção da  $\alpha$ -talassemia através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em uma população selecionada apresentando microcitose e hipocromia.**

**Comissão Julgadora**

**Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE**

**Prof. Dr. Mário H. Hirata  
(Orientador/Presidente)**

**Prof. Dr. Pedro Enrique Dorlhiac Llacer  
1º. Examinador**

**Prof.a. Dra. Nanci Amaral Rebouças  
2º. Examinador**

**21 DE JUNHO DE 2000**

Ao meu pai (*in memoriam*), à  
minha filha e ao meu  
marido.

---

## Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Mário H. Hirata, meu orientador, Professor Associado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Laboratório de Biologia Molecular), pelo incentivo, apoio e amizade.

À Prof. Dra. Sandra Fátima Menosi Gualandro, chefe do Laboratório de Hematologia do Serviço de Hematologia e Hemoterapia da I Clínica Médica do HCFMUSP e da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, Docente da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Iara e Deise do Laboratório de Hematologia do Serviço de Hematologia e Hemoterapia da I Clínica Médica do HCFMUSP e da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, sem as quais seria impossível a realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Rosário Hirata e aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de São Paulo, que sempre estiveram prontos para esclarecer as dúvidas de procedimentos técnicos e teóricos.

Ao Dr. Ricardo Omoto, pelo apoio e incentivo no início deste trabalho.

Ao Dr. Mário Ivo Serinolli e ao Dr. Pedro Enrique Dorlhiac Llacer, pelo apoio, incentivo e compreensão na segunda etapa deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Controle de Qualidade do Sangue da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo pelo apoio, incentivo e compreensão.

Ao meu marido pelo apoio, ajuda, paciência e compreensão.

À minha filha pela compreensão, quando não podíamos brincar.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, abastecendo-me de muita força para a conclusão do mesmo.

---

## Sumário

Resumo/ Summary .....	i
<b>1. Introdução .....</b>	<b>2</b>
1.1 Estrutura e função da hemoglobina .....	2
1.2 Ontogenia das hemoglobinas .....	3
1.3 Base molecular das $\alpha$ -globinas .....	5
1.4 As $\alpha$ -talassemias .....	9
1.4.1 Histórico .....	9
1.4.2 Definição e classificação .....	10
1.4.3 Base molecular da $\alpha$ -talassemias .....	12
1.4.4 Fisiopatologia das $\alpha$ -talassemias .....	17
1.4.4.1 Características clínicas e laboratoriais .....	18
1.4.5 Origem dos genes da $\alpha$ -talassemia .....	19
1.4.5.1 Distribuição geográfica .....	19
1.4.5.2 Hipótese da malária .....	21
1.4.6 Diagnóstico laboratorial .....	23
1.4.6.1 A técnica da PCR (Reação em cadeia da polimerase) .....	24
1.4.7 Mutação estudada .....	27
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>29</b>
<b>3. Material e métodos .....</b>	<b>31</b>
3.1 Casuística .....	31
3.2 Materiais .....	33
3.2.1 Reagentes .....	33
3.2.1.1 Extração do DNA genômico .....	33
3.2.1.2 Reação em cadeia da polimerase .....	33
3.2.1.3 Eletroforese e revelação .....	33
3.2.2 Amostras biológicas .....	34
3.3 Métodos .....	34
3.3.1 Determinação da deleção $-\alpha^{3,7}$ no agrupamento de genes da $\alpha$ -globina .....	34
3.3.1.1 Extração do DNA genômico .....	34
3.3.1.2 Dosagem e confirmação da extração do DNA genômico .....	35
3.3.1.3 Amplificação in vitro do DNA pela técnica da PCR .....	36
3.3.1.3.1 Otimização da amplificação de fragmentos do DNA para detecção da deleção $-\alpha^{3,7}$ .....	36
3.3.1.3.2 Otimização da amplificação de fragmentos do DNA que flanqueia a região 5' do gene $\theta_1$ .....	39
3.3.1.4 Análise dos produtos amplificados .....	40
<b>4. Resultados .....</b>	<b>43</b>
4.1 Otimização da PCR .....	43
4.1.1 Avaliação da concentração de cloreto de magnésio, temperatura de hibridação e adição de desnaturante químico .....	43

4.2 Análise das amostras dos indivíduos com microcitose e hipocromia não esclarecidas .....	45
5. Discussão .....	48
6. Conclusão .....	56
Referências .....	58

---

Oliveira, C.S. Detecção da  $\alpha$ -talassemia através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em uma população selecionada apresentando microcitose e hipocromia. São Paulo, 2000. 71 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

## RESUMO

**Objetivos** Identificar  $\alpha$ -talassemia em indivíduos com hipocromia e microcitose a esclarecer. **Material e métodos** Amostras de sangue e o prontuário de 23 indivíduos com microcitose e hipocromia, selecionados dentre 7200 pacientes de um hospital público da cidade de São Paulo foram investigados para a deleção - $\alpha^{3,7}$ . Estes indivíduos apresentaram níveis normais de hemoglobina e metabolismo do ferro e eletroforese de hemoglobina sem alterações. Foi efetuado pesquisa intra-eritrocitária de hemoglobina H através do método do "Azul de cresil brilhante 1%" e análise do DNA pela técnica da PCR, com a utilização de primers para detecção da deleção - $\alpha^{3,7}$  nos genes que codificam a  $\alpha$ -globina. **Resultados** Onze dos 23 indivíduos estudados (47,83 %) apresentaram  $\alpha$ -talassemia, sendo 90,91 % (10/11) heterozigotos e 9,09 % (1/11) homozigoto para a deleção - $\alpha^{3,7}$ . Entretanto, somente 36,36 % (4/11) dos indivíduos apresentaram pesquisa intra-eritrocitária de HbH positiva. Doze indivíduos apresentaram genótipos normais para a deleção - $\alpha^{3,7}$ . **Conclusão** A técnica da PCR utilizada neste estudo é uma técnica simples, prática e de baixo custo, podendo ser facilmente implantada na rotina de um laboratório.

Oliveira, C.S. Detection of  $\alpha$ -thalassemia in a selected population with microcytosis and hypochromia by polymerase chain reaction technique (PCR). São Paulo, 2000. 71 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

## SUMMARY

**Objective** To identify  $\alpha$ -thalassemia in individuals with microcytosis and hypochromia. **Materials and methods** Blood samples and medical records of 23 individuals with microcytosis and hypochromia selected from 7200 patients of a public hospital in São Paulo city were investigate for  $-\alpha^{3,7}$  deletion. They have been presented normal levels of hemoglobin, iron metabolism and hemoglobin electrophoresis. Supravital staining with brilliant cresyl blue to detect the presence of hemoglobin H bodies and polymerase chain reaction (PCR) DNA analysis with primers to detect the  $-\alpha^{3,7}$  deletions at the  $\alpha$ -globin gene cluster has been performed. **Results** Eleven of 23 individuals studied (47,83 %) showed  $\alpha$ -thalassemia, 10 (90,91%) with heterozygous and 1 (9,09 %) with homozygous genotypes for  $-\alpha^{3,7}$  deletion. However, only in 4 of these 11 (36,36 %) hemoglobin H bodies were observed. Twelve individuals showed normal genotypes for  $-\alpha^{3,7}$  deletion. **Conclusion** The PCR technique used in this study is useful, practical and very economic to introduce in the routine for clinical laboratoy.

**Introdução**

---

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Estrutura e função da hemoglobina

A hemoglobina foi descoberta no início na década de 1950. Ainda nesta década a sua conformação de  $\alpha$ -hélice foi descrita por Linus Pauling. Na década de 1960, foram descobertas as cadeias  $\alpha$  (alfa) e  $\beta$  (beta) das globinas, o controle genético independente destas cadeias e as cadeias das hemoglobinas fetal e  $A_2$ . Relacionou-se também a estrutura tridimensional da hemoglobina com suas propriedades funcionais. Estes conhecimentos junto com as descobertas de hemoglobinas anormais levaram a um rápido progresso em direção ao entendimento do controle genético da hemoglobina humana (Lehninger, 1988; Murayama, 1979; Weatherall et al., 1989).

A hemoglobina, contida nos eritrócitos, tem a capacidade de se ligar, transportar e liberar moléculas de  $O_2$  e  $CO_2$  ou íons  $H^+$  através do organismo. A dinâmica da reação da hemoglobina com o oxigênio, a torna específica para a sua função. A molécula da hemoglobina possui quatro cadeias polipeptídicas (duas  $\alpha$  - alfa e duas  $\beta$  - beta) e um grupo heme ligado a cada uma destas cadeias. A combinação do primeiro heme de uma molécula de hemoglobina com o oxigênio, aumenta a afinidade do segundo grupo heme e assim sucessivamente, até a quarta ligação (Lehninger, 1988; Weatherall et al., 1989).

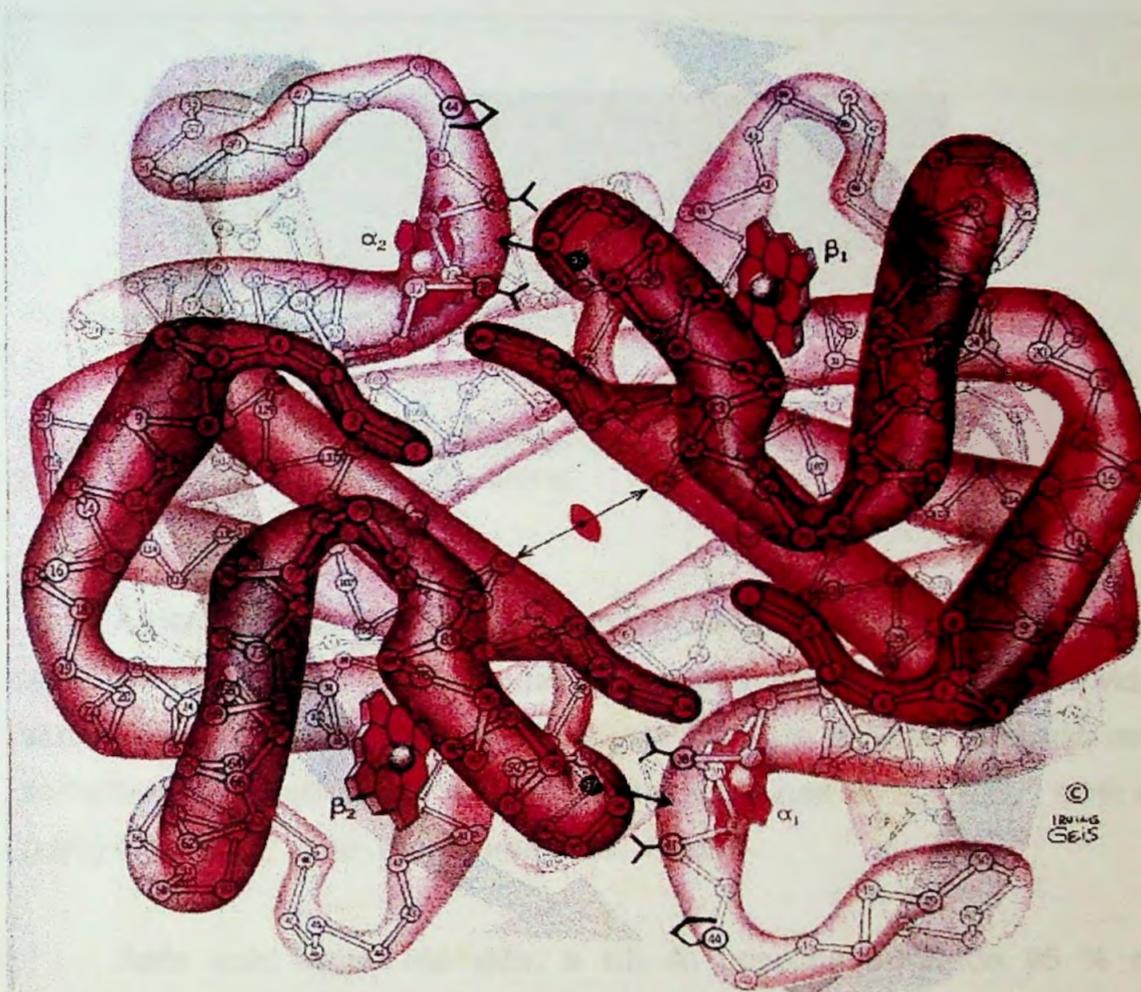
A molécula da hemoglobina apresenta ligações entre as cadeias que promovem a sua forma globular, ficando elas ligadas em  $\alpha_1\beta_2$  e  $\alpha_2\beta_1$  por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. A interação entre as cadeias ocorre com menos firmeza com uma das cadeias dissimilares do que com a

outra e o local desta ligação é chamado plano natural de clivagem, o qual tem importância na regulação da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. As cadeias  $\alpha$  são as  $\alpha$ -globinas, com 141 resíduos de aminoácidos e as cadeias  $\beta$  são as  $\beta$ -globinas, com 146 resíduos de aminoácidos (Fig. 1, pág. 4). O seqüenciamento de aminoácidos da hemoglobina humana, elucidado por Braunitzer em 1960, tornou possível calcular o peso molecular das cadeias da hemoglobina, totalizando este 64.500 daltons (Lehninger, 1988; Murayama, 1979; Weatherall et al., 1989).

Dois fatores regulam a afinidade da hemoglobina pelo  $O_2$ , sendo eles, o efeito Bohr e o 2,3-DPG ( 2,3-difosfoglicerato). O 'efeito Bohr', está intimamente relacionado ao pH. Para valores baixos de pH, a afinidade da hemoglobina pelo  $O_2$  é menor (Babior e Stossel, 1994). O 2,3 DPG que existe em grandes quantidades nos eritrócitos é produto do ácido 1,3 difosfoglicérico, um intermediário glicolítico que aparece durante a conversão da glicose em ácido láctico. A pressão parcial de  $O_2$  nos pulmões é que regula a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio feita pelo 2,3 DPG, que se liga a hemoglobina através do N-terminal das cadeias  $\beta$ , localizadas na sua cavidade central (Rawn, 1989).

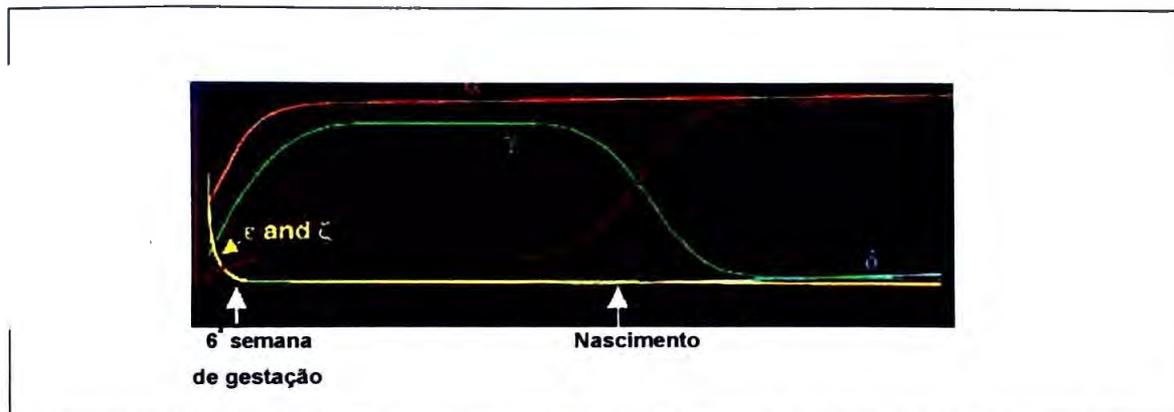
## 1.2 Ontogenia das hemoglobinas

As cadeias das globinas que compõem as hemoglobinas humanas em diferentes estágios do desenvolvimento são as cadeias  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta),  $\gamma$  (gama),  $\delta$  (delta),  $\epsilon$  (épsilon) e  $\zeta$  (zeta). As hemoglobinas provém das famílias  $\alpha$  (cadeias  $\alpha$  e  $\zeta$ ), codificada pelo cromossomo 16 e  $\beta$  (cadeias  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ ), codificada pelo cromossomo 11 (Weatherall et al., 1989).



**Figura 1:** Estrutura tetramérica da molécula da hemoglobina humana (VOET & VOET, Biochemistry, John Wiley & Sons, INC. 1995 2a. ed., p.225).

As hemoglobinas de células embrionárias são as hemoglobinas Gower I, constituída de duas cadeias  $\zeta$  e duas  $\epsilon$  ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), Gower II, que apresenta cadeias  $\alpha$  e  $\epsilon$  ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) e Portland, com cadeias  $\zeta$  e  $\gamma$  ( $\zeta_2\gamma_2$ ), sendo esta última a maior hemoglobina embriônica do tipo  $\alpha$  (Fig. 2, pág. 5). Estas hemoglobinas aparecem no embrião a partir da terceira semana de gestação e permanecem até a décima semana quando desaparecem, com exceção da hemoglobina Portland, que pode ser detectada em mínimas quantidades (apenas traços) no feto e nunca mais retorna (Olivieri, 1997; WHO Working Group, 1982).



**Figura 2:** As cadeias de globinas durante as fases embrionária, fetal e pós nascimento ( $\alpha$ -talassemia INTERNET Sabbath – slide 8)

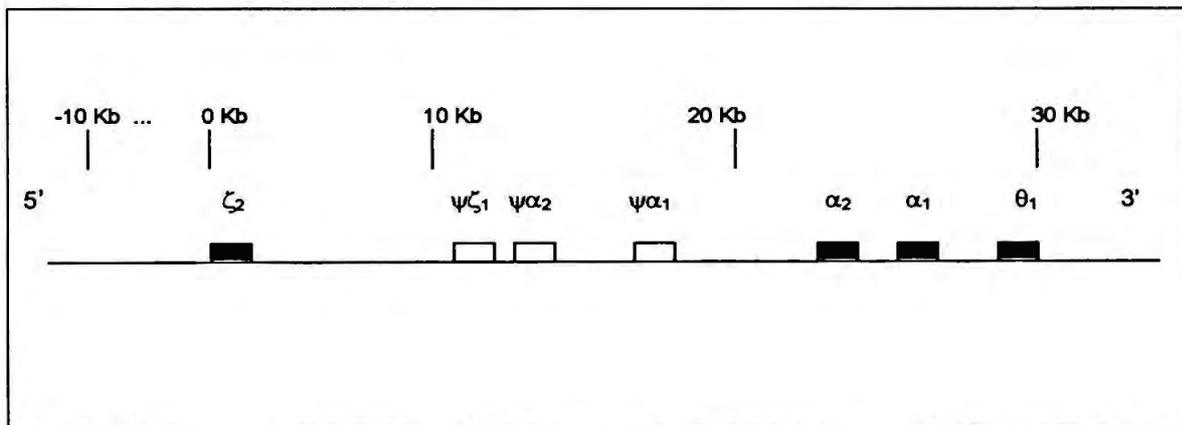
A hemoglobina fetal (Hb F) é composta por duas cadeias  $\alpha$  e duas  $\gamma$  ( $\alpha_2\gamma_2$ ). Permanece no indivíduo até aproximadamente seis meses de vida, sendo a responsável por liberar oxigênio para os tecidos. Passado este período a hemoglobina fetal dá lugar as hemoglobinas Hb A<sub>1</sub> ( $\alpha_2\beta_2$ ) e Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) (Rapaport, 1990; Weatherall et al., 1965).

Após seis meses de vida, a Hb A<sub>1</sub> constitui cerca de 95 % da hemoglobina encontrada nas células vermelhas e é a mais sensível ao efeito do 2,3 DPG. A Hb A<sub>2</sub> começa a aparecer após o nascimento, continua aumentando até o primeiro ou segundo ano de vida e não ultrapassa mais do que 1 - 3,5 % nas células. Contudo, a Hb A<sub>2</sub> fornece instrumento médico como ferramenta para diagnóstico usual na avaliação de pacientes com  $\beta$ -talassemias, pois encontra-se aumentada (Rapaport, 1990; Weatherall et al., 1965; Weatherall et al., 1989).

### 1.3 Base molecular das $\alpha$ -globina

Na síntese das  $\alpha$ -globinas, são incluídas as globinas com cadeias tipo  $\zeta$  (zeta) e  $\alpha$  (alfa). O agrupamento dos genes das  $\alpha$ -globinas, localizados no

braço curto do cromossomo 16, na região 16p.13.3 (Breuning et al., 1987; Buckle et al., 1988), é composto pelos genes  $\zeta_2$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ , três pseudogenes  $\psi\zeta_1$ ,  $\psi\alpha_2$ ,  $\psi\alpha_1$  (psi-zeta, psi-alfa e psi-alfa, respectivamente) e um gene com função não muito bem definida, o gene teta ( $\theta_1$ ) localizado à aproximadamente 4 Kb da região 3' do gene  $\alpha_1$ , sendo representado por 5'- $\zeta_2$ - $\psi\zeta_1$ - $\psi\alpha_2$ - $\psi\alpha_1$ - $\alpha_2$ - $\alpha_1$ - $\theta_1$ -3' com aproximadamente 40Kb (Fig. 3) (Hardison et al., 1986; Higgs et al., 1998; Lauer et al., 1980; Marks et al., 1986; Nicholls et al., 1987; Shaw et al., 1987; Weatherall, 1997). Acredita-se que os pseudogenes são produtos do processo evolutivo, representando previamente genes funcionais, nos quais alterações nas seqüências de regiões codificadoras e regulatórias levaram à inativação destes genes (Nienhuis et al., 1984). Cada gene possui 3 éxons (regiões codificadoras) e 2 íntrons (regiões não codificadoras) (Proudfoot e Maniatis, 1980).



**Figura 3:** Disposição dos genes da hemoglobina  $\alpha$ , localizados no braço curto do cromossomo 16. Os retângulos preenchidos representam os genes. Os retângulos sem preenchimento representam os pseudogenes.

A transcrição das seqüências de bases nitrogenadas do DNA de cada gene da globina se realiza após separação da molécula de DNA e é executada pelo RNA heterogêneo ou transcrito primário, o qual contém éxons e íntrons. Este RNA começa a ter suas primeiras modificações nas extremidades 5' e 3', que conferem a manutenção da estabilidade durante o processo de síntese protéica, até chegar à forma de RNA mensageiro

funcional. Na extremidade 5' um ácido guanílico forma uma estrutura cônica, denominada capuz metilado (*cap site*). Na extremidade 3' ocorre a adição de uma série de ácidos adenílicos, chamados de "cauda poli-A", a qual pode ser importante para o transporte do RNA mensageiro (RNAm) do núcleo para o citoplasma, assim como para a sua estabilidade (Darnell, 1982; Naoum e Domingos, 1997; Proudfoot e Browlee, 1976a; Proudfoot e Brownlee, 1976b).

Para que o RNA transcrito primário se torne um RNAm funcional existem seqüências fundamentais, que delimitam as regiões éxons-íntrons, para a remoção dos íntrons e união dos éxons. As seqüências de íntrons são removidas e as seqüências de éxons são unidas (*splicing*) na ordem correta para formar um molde (*template*) para a produção das  $\alpha$ -globinas. Este processo ocorre no núcleo de uma célula vermelha precursora (reticulócitos). A seguir, estas moléculas processadas se movem para o citoplasma, onde atuam como um projeto (*blueprint*), através do qual, aminoácidos apropriados são colocados juntos para formar as cadeias definitivas das globinas. As talassemias resultam de mutações ou deleções de genes envolvidos com um destes complexos passos (Nienhuis et al., 1984; Weatherall, 1997).

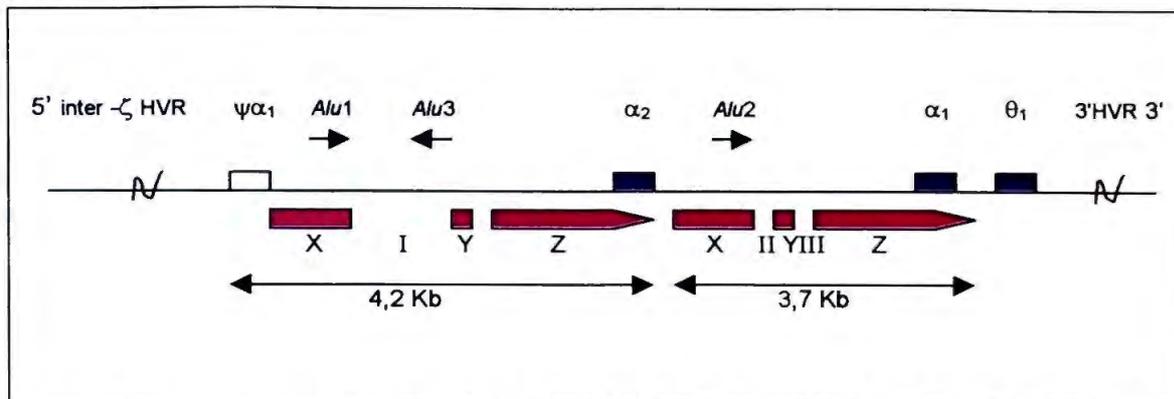
As seqüências de bases nitrogenadas nos genes  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$  apresentam grande homologia. Com exceção de duas regiões não homólogas, os dois genes estão embutidos em uma unidade de duplicação, cada uma ocupando aproximadamente 4 Kb do DNA cromossomal (Hess et al., 1983; Michelson e Orkin, 1983; Proudfoot e Maniatis, 1980).

As proteínas codificadas por cada um destes loci são idênticas (Liebhaber et al., 1981). A quantidade de RNA mensageiro (RNAm) para cada um dos genes  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$  foi determinada em reticulócitos. Este experimento mostrou que o nível constante de RNAm  $\alpha_2$  predomina sobre o

de RNAm  $\alpha_1$  numa proporção aproximada de 3:1, provavelmente como resultado da diferença no nível de transcrição dos dois genes. Acredita-se que a diferença entre as quantidades de cada RNAm não reflita nos níveis das proteínas, pois a mensagem do gene  $\alpha_1$  é traduzida mais rapidamente. Portanto, a diferença de síntese entre estes dois genes não é significativa (Higgs et al., 1998; Liebhaber e Kan, 1981; Naoum e Domingos, 1997; Smetanina et al., 1996; Weatherall et al., 1989).

Cada gene alfa está localizado dentro de 2 regiões que apresentam grande homologia entre si, representadas pelas letras X, Y e Z, que são interrompidas por três regiões curtas e não-homólogas, sendo elas as regiões I, entre o pseudogene  $\psi\alpha_1$  e o gene  $\alpha_2$  e as regiões II e III entre os genes  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ . No agrupamento dos genes alfa há duas regiões hipervariáveis (HVR), uma entre o gene  $\zeta_2$  e o pseudogene  $\psi\zeta_1$  e outra após o gene  $\theta_1$  (Fig. 4, pág. 9) (Hess, 1984; Naoum et al.1997; Proudfoot e Maniatis, 1980). O DNA entre os genes da globina incluem cópias de várias famílias de seqüências repetitivas (Fig. 4, pág. 9) (Nienhuis et al., 1984).

Apesar de as seqüências das porções 3' dos dois blocos X serem altamente homólogas, elas contém um número significativo de substituições de bases e pequenas deleções ou inserções no DNA. A porcentagem de divergências nas regiões seqüenciadas é de aproximadamente 12,3 %. Os dois blocos X terminam com repetições da família *Alu*, que é a maior família de repetições intercaladas no DNA humano. Estas seqüências foram denominadas de *Alu1* e *Alu2*. O final 3' da região não-homóloga I é ocupado por uma fusão de dois membros da família *Alu*, o *Alu3*, que ocorre em uma orientação invertida com relação as famílias *Alu1* e *Alu2* (Fig. 4, pág. 9) (Hess et al., 1983).



**Figura 4.** Representação esquemática (modificada). Regiões X, Y e Z homólogas entre os espaços  $\psi\alpha_1$  e  $\alpha_2$  e entre os genes  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ . Estas regiões homólogas têm diferentes tamanhos em número de bases nitrogenadas: 3,7 Kb e 4,2 Kb. Regiões I, II e III não-homólogas. Regiões hipervariáveis (HVR), representadas pelas linhas curvas. Setas superiores indicam as regiões que contêm as famílias de repetições *Alu*. Linhas horizontais inferiores indicam a extensão das regiões delimitadas pelas setas. Os retângulos preenchidos indicam os genes  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$  e  $\theta_1$  e o retângulo sem preenchimento o pseudogene  $\psi\alpha_1$  (Naoum, 1997).

## 1.4As $\alpha$ - talassemias

### 1.4.1 Histórico

A primeira suposição de talassemia ocorreu em 1925 quando Cooley e Lee relataram casos de esplenomegalia e alterações medulares em crianças. Em 1936 George H. Whipple e William L. Bradford publicaram uma avaliação dos achados patológicos destas doenças (In: Weatherall, 1995). Em 1940 foram relatados vários casos de pacientes assintomáticos portadores de anemia, porém estes casos poderiam representar outras doenças que não talassemias (Chernoff, 1959).

Simultaneamente aos estudos sobre a hemoglobina, também foram descritas na década de 1950 a anemia falciforme como sendo uma doença genética, a caracterização da sua patologia molecular e observações de varias partes do mundo, que levaram às noções de que a talassemia é uma desordem genética com muitas características em comum com hemoglobinas variantes (Weatherall et al., 1989).

Na metade da década de 50, foi descoberta a hemoglobina H (Hb H), assim denominada por apresentar mobilidade eletroforética maior que a Hb A<sub>1</sub> (Rigas et al., 1955). No final desta década, foi estabelecida a estrutura da Hb H como sendo quatro cadeias  $\beta$  ( $\beta_4$ ), arranjadas na forma de um tetrâmero. Nesta época foram reconhecidas as maiores síndromes (Doença da Hb H e Hidropsia Fetal) resultantes das  $\alpha$  - talassemias, através da associação entre hemoglobinas anormais com anemia microcítica e hipocrômica sem a deficiência de ferro (Jones et al., 1959).

Em 1965, com a possibilidade de medir a proporção entre as sínteses das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  das globinas, foi observado uma diminuição progressiva na síntese da cadeia  $\alpha$  em portadores de  $\alpha$  - talassemias, Doença de Hb H e na Síndrome da Hidropsia fetal, respectivamente (Weatherall et al., 1965; Weatherall et al., 1989).

Em 1969 foram relacionadas a Doença da Hb H com casamentos entre portadores de  $\alpha$  - talassemia 1 e  $\alpha$  - talassemia 2 e a Hidropsia fetal com casamentos entre portadores de  $\alpha$  - talassemia 1 (Higgs et al., 1989). Detalhes sobre estes tipos de talassemias são encontrados no item 1.4.2 Definição e classificação. No início de 1970 os pesquisadores estudavam sobre o controle genético da hemoglobina humana, as variantes estruturais, os defeitos biossintéticos e a heterogeneidade das  $\alpha$ -talassemias. Com todas estas informações e novas ferramentas da biologia celular e molecular, foi possível em menos de 10 anos descrever muitas das patologias moleculares da hemoglobina. O campo estava pronto para as técnicas de DNA recombinante (Weatherall et al., 1989). A explosão no entendimento sobre a organização e a estrutura dos genes marcou a caracterização de várias mutações específicas para  $\alpha$ -talassemias com relação às seqüências de DNA (Nienhuis et al., 1984).

#### **1.4.2 Definição e classificação**

As  $\alpha$ -talassemias, um dos defeitos genéticos mais comuns distribuídos no mundo (Wilkie et al., 1990), pertencem a um grupo heterogêneo de desordens da síntese da hemoglobina, caracterizadas pela produção ausente ( $\alpha^0$ -talassemia) ou diminuída ( $\alpha^+$ -talassemia) das cadeias das  $\alpha$ -globinas (Ayala et al., 1997; Embury et al., 1980; Forget, 1979). Menos freqüentemente, as  $\alpha$ -talassemias resultam de pontos de mutações (então chamadas de  $\alpha$ -talassemias não-delecionais), envolvendo geralmente o gene  $\alpha_2$  ( $\alpha^T\alpha$ ) e mais raramente o gene  $\alpha_1$  ( $\alpha\alpha^T$ ) (Hall et al., 1993; Higgs et al., 1989). Isto leva a um desequilíbrio na síntese destas cadeias, devido à uma disfunção em um ou mais genes dos quatro que aparecem no par de cromossomos 16 (Naoum et al.1997), que é a marca registrada das síndromes talassêmicas (Weatherall, 1989).

As talassemias são doenças hereditárias autossômicas recessivas (George et al., 1996). Assim, a maioria das formas de talassemias são herdadas de modo recessivo Mendeliano. Pais portadores que apresentam sintomas leves tem 25 % de chance de ter filhos severamente afetados (Weatherall, 1997). O indivíduo normal para a produção de  $\alpha$ -globinas tem seu genótipo representado por dois haplótipos  $\alpha\alpha$ . A espécie humana é diplóide e a representação para a presença normal dos genes alfa é  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$  (Tab.1, pág. 12) (Naoum et al.1997).

As síndromes talassêmicas são classificadas (Tab. 1, pág. 12) de acordo com o número de genes  $\alpha$  lesados. O grau da lesão pode ser variável, afetando o gene parcial ou totalmente. Esta classificação se divide em: a) portador silencioso,  $\alpha$ -talassemia mínima ou  $\alpha$ -talassemia-2 heterozigota, que resulta da deleção de um dos quatro genes da  $\alpha$ -globina ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ); b) traço  $\alpha$ -talassêmico,  $\alpha$ -talassemia menor ou  $\alpha$ -talassemia-1, que resulta da deleção de dois genes da  $\alpha$ -globina, normalmente no mesmo cromossomo ou  $\alpha$ -talassemia-2 homozigota, resultante da deleção de um gene de cada cromossomo ( $--/\alpha\alpha$  ou  $-\alpha/-\alpha$ , respectivamente); c) Doença de

HbH ou  $\alpha$ -talassemia intermediária, onde existe alguma síntese das cadeias da  $\alpha$ -globina, usualmente em níveis três vezes menores do que a quantidade da síntese da cadeia da  $\beta$ -globina ( $- \alpha$ ). Como resultado, excesso de  $\beta$ -globinas se acumulam e formam tetrâmeros que constituem a hemoglobina H e; d) Hidropsia Fetal ( $- -$ ), a qual resulta da completa ausência da função dos genes da  $\alpha$ -globina ( $\alpha^0$ ) devido a homozigose para a  $\alpha$ -talassemia-1 (Bowie et al. 1997; Forget, 1979; Naoum et al.1997; Steinberg et al., 1986; Taylor et al., 1974).

**Tabela 1: Fenótipos e genótipos das  $\alpha$ -talassemias**

Fenótipo	Número de genes $\alpha$ funcionais	Interação de haplótipos	Genótipos encontrados mais frequentemente
Normal	4	$\alpha/\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Portador silencioso	3	$\alpha^+/\alpha$	$- \alpha/\alpha\alpha$
Traço $\alpha$ -talassêmico	2	$\alpha^0/\alpha$ ou $\alpha^+/\alpha^+$	$- -/\alpha\alpha$ $- \alpha/- \alpha$ $\alpha^T/\alpha\alpha$
Doença da Hb H	1	$\alpha^0/\alpha^+$ ou $\alpha^+/\alpha^+$	$- -/\alpha -$ $- -/\alpha^T\alpha$ $\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$
Hidropsia fetal	0	$\alpha^0/\alpha^0$	$- -/- -$ $- -/\alpha^T\alpha^T$

**Legenda:** Haplótipos:  $\alpha$  - representa gene com produção normal das cadeias da  $\alpha$ -globina;  $\alpha^+$  - representa gene com produção diminuída das cadeias da  $\alpha$ -globina;  $\alpha^0$  - representa gene com produção ausente das cadeias da  $\alpha$ -globina. Genótipos:  $\alpha\alpha/$  - normal;  $- \alpha/$  - deleção de um gene  $\alpha$ ;  $- -/$  - deleção dos dois genes  $\alpha$ ;  $\alpha^T\alpha/$  - mutação não deletional no gene  $\alpha_2$  (normalmente as mutações acometem o gene  $\alpha_2$ ).

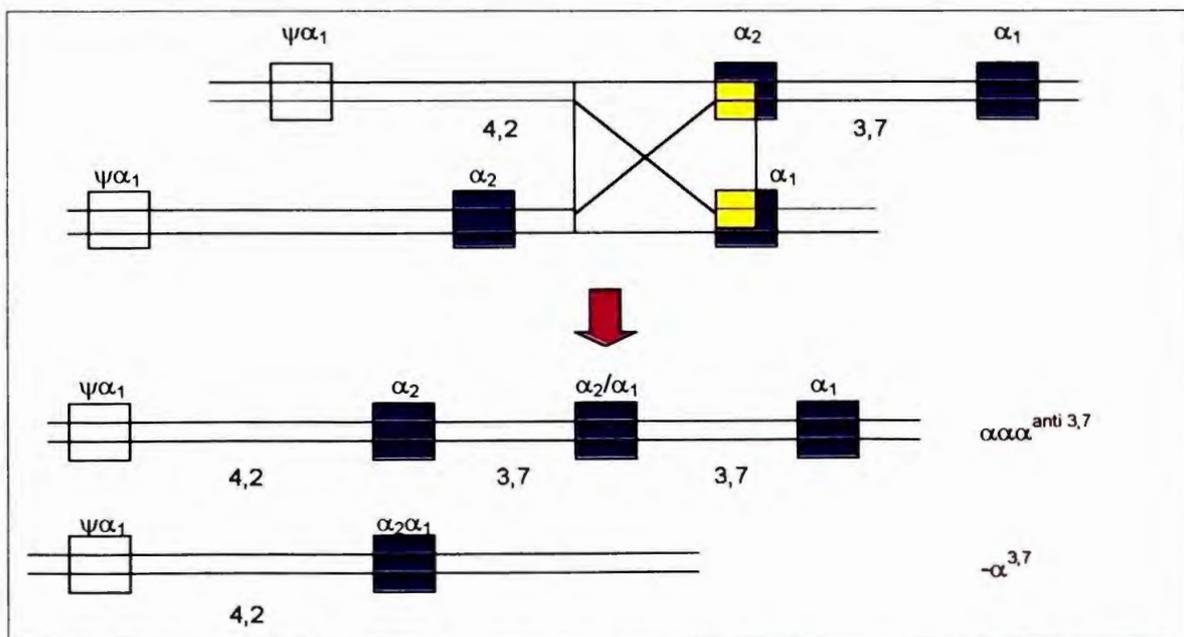
**Nota:** Tabela modificada (Lukens, 1993; Weatherall et al., 1989).

### 1.4.3 Base molecular da alfa talassemia

Alterações nos genes  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$  provocam a diminuição ou ausência da síntese das cadeias das  $\alpha$ -globinas, resultando no desequilíbrio entre as  $\beta$ -globinas, que continuam sendo produzidas normalmente, permanecendo assim em excesso. Tal desequilíbrio entre as cadeias caracteriza a base fisiopatológica das  $\alpha$ -talassemias. A grande maioria das mutações ocorrem

no gene da globina  $\alpha_2$  (Chitayat et al., 1997; Mach-Pascual et al., 1996; Smetanina et al., 1996).

Como regra geral, as mutações que acometem os genes responsáveis pela produção das  $\alpha$ -globinas e desencadeiam as talassemias são do tipo *cis*, as quais afetam somente o gene no qual ocorre a mutação, alterando diretamente sua estrutura, comprometendo sua função (Nienhuis et al., 1984). Na maioria das vezes as  $\alpha$ -talassemias ocorrem por deleções. Os genes  $\alpha$  são aparentemente predispostos às deleções devido a presença de seqüências repetitivas duplicadas, que ocorrem neste agrupamento de genes (Lauer et al., 1980; Liebhaber et al, 1981), acarretando à eventos de recombinação, que ocorrem particularmente por efeito de *crossing-over* desigual pelo desalinhamento entre as duas fitas de DNA de dois cromossomos separados durante o processo de meiose, promovendo a deleção de um ou dois genes da  $\alpha$ -globina (Fig. 5) (Fichera et al., 1997; Naoum et al., 1997; Nienhuis et al., 1984).



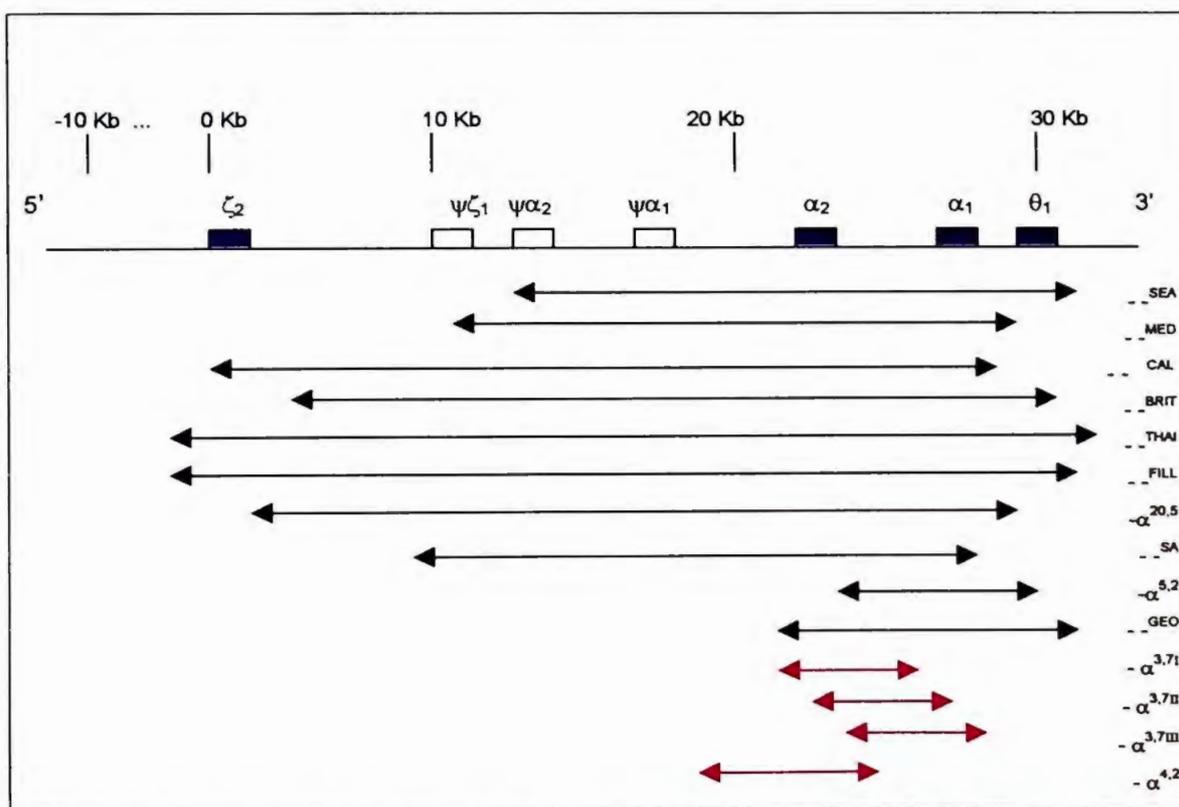
**Figura 5:** *Crossing-over* desigual entre dois cromossomos 16. Inserção de três genes alfas ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_2/\alpha_1$ ,  $\alpha_1$ ), representada como  $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 3,7}$ , num dos cromossomos. No outro, um gene híbrido ( $\alpha_2/\alpha_1$ ), representado por  $-\alpha^{3,7}$  (Naoum, Hemoglobinopatias e talassemias, Sarvier Editora de Livros Médicos, 1997, p.101).

Há uma deleção que envolve a região homóloga 3' do pseudogene  $\psi\alpha_1$  de um cromossomo e a região 3' do gene  $\alpha_2$ , levando a remoção de 4,2 Kb do DNA (Embury et al., 1979). Há outra deleção envolvendo os segmentos homólogos do tipo Z contidos nos genes  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ , que leva a perda de 3,7 Kb do DNA e deixa um simples gene  $\alpha_2$  ou  $\alpha_1$  ou um gene  $\alpha$  híbrido ( $\alpha_2/\alpha_1$ ) em um dos cromossomo (Fig. 6, pág. 15), devido a dois tipos de *crossing over*, respectivamente. Um que ocorre nos segmentos I e II e outro que ocorre no segmento III da região Z. Nos segmentos I e II o ponto de recombinação aparece nas regiões de completa homologia entre os genes  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  apresentando RNAm do tipo  $\alpha_1$ . Aquele que aparece no segmento III apresenta RNAm do tipo  $\alpha_2$ . Os indivíduos mais afetados parecem ser os homozigotos ( $-\alpha^{3,7} / -\alpha^{3,7}$ ) ou os duplos heterozigotos ( $-\alpha^{3,7} / -\alpha$ ) (Higgs et al., 1984; Williams et al., 1996; Rees et al., 1998). Estes dois defeitos genéticos são conhecidos como deleção  $-\alpha^{4,2}$  ou deleção para a esquerda (*leftward*) e deleção  $-\alpha^{3,7}$  ou deleção para a direita (*rightward*) (Dozy et al., 1979; Fichera et al., 1997; Naoum et al., 1997).

Mais de dez deleções que causam  $\alpha$ -talassemia 1 foram relatadas no mundo (Ko et al., 1998). As extensões destas deleções foram definidas por mapeamento com endonucleases de restrição e podem compreender de 5,2 a 62 Kb (Nienhuis et al., 1984; Weatherall et al., 1989). As mais comuns são as deleções  $-\alpha^{\text{MED}}$ ,  $-\alpha^{20,5}$  e  $-\alpha^{\text{SEA}}$ , que perdem de 20 a 30 Kb de DNA no agrupamento de gene da  $\alpha$ -globina (Chang et al., 1991; Chan et al., 1996; Ko et al., 1998; Nicholls et al., 1987; Schilirò et al., 1997). Outras que se encaixam nesta categoria são as deleções  $-\alpha^{\text{CAL}}$  (Fortina et al., 1991; Villegas et al., 1994);  $-\alpha^{\text{BRIT}}$ ,  $-\alpha^{\text{THAI}}$  e  $-\alpha^{\text{FIL}}$ , nas quais estão removidos mais de 30 Kb do DNA (Higgs et al., 1985; Higgs et al., 1999; Ko e Li, 1999; Ko et al., 1998) (Fig. 6, pág. 15), dentre outras.

Várias formas de  $\alpha$ -talassemias ocorrem devido a mutações não-delecionais, as quais compreendem um grupo de mutações distinto e

heterogêneo, que leva à ausência ou redução na expressão dos genes  $\alpha$ , que estão estruturalmente intactos (Nienhuis et al., 1984). Existe uma sobreposição entre hemoglobinas variantes e talassemias. Algumas hemoglobinas anormais são produzidas em proporções reduzidas e são associadas com fenótipos clínicos de talassemias. As lesões moleculares que sublinham as formas não-delecionais das  $\alpha$ -talassemias são relativamente incomuns e suas distribuições geográficas são limitadas (Weatherall et al., 1989).



**Figura 6:** Representação esquemática (modificada) dos principais tipos de deleções no agrupamento dos genes  $\alpha$ , que causam a  $\alpha^0$ -talassemia. As linhas pretas são as chamadas "grandes deleções" (*large deletions*) (Chen et al., 1993; Fei et al., 1992; Fischel-Ghodisian et al., 1988; Fortina et al., 1991; Ko e Li, 1999; Naoum, 1997; Oron-Kami et al., 1998; Pressley et al., 1980a; Pressley et al., 1980b; Vandenplas et al., 1987; Weatherall et al., 1989)

Foram identificadas mutações no códon de terminação (UAA) do RNAm da  $\alpha$ -globina, que levam ao alongamento das cadeias  $\alpha$ . As hemoglobinas que daí resultam são estruturalmente diferentes somente no aminoácido do códon terminal. A primeira hemoglobina deste tipo a ser descoberta foi a hemoglobina Constant Spring (HbCS) (Sudeste da Ásia) (Clegg et al.; 1971). Posteriormente foram descobertas as hemoglobinas Icária ( $\alpha^{Ic}\alpha$ ) em povos do Mediterrâneo, Koya Dora ( $\alpha^{KD}\alpha$ ) em povos do Oriente e Seal Rock ( $\alpha^{SR}\alpha$ ) em negros, que também são hemoglobinas que apresentam mutações no códon terminal (Bradley et al., 1975; Clegg et al., 1974; DeJong et al., 1975; Higgs e Weatherall, 1983; Liebhaber et al., 1987; Merrit et al., 1997; Nienhuis et al., 1984; Waye et al., 1994).

Duas outras mutações não deletionais afetam o processamento do RNA transcrito primário. Uma delas é a deleção de um pentanucleotídeo incluindo a região 5' do sítio de união do intron 1 (onde deveria ocorrer a junção de dois éxons - *splice junction*) do gene  $\alpha_2$  da globina ( $\alpha^{Hph}\alpha$ ), abolindo a remoção normal do intron 1 durante o processo (Felber et al., 1982; Orkin et al., 1981; Traeger-Synodinos et al., 1993). Outra é a substituição de uma única base no sinal de poliadenilação (cauda poli-A), descoberta a partir de um gene da  $\alpha$ -globina clonado do DNA de um indivíduo com Doença da Hb H, no início da década de 80, que leva à uma redução quantitativa na produção do RNA mensageiro e consequentemente da  $\alpha$ -globina neste indivíduo (Higgs et al., 1983).

Dentre as mutações não-deletionais foram identificadas ainda: - uma mutação no códon de iniciação do gene  $\alpha_2$  ( $\alpha^{Nco}\alpha$ ), que revela uma substituição de ATG para ACG e abole a função deste gene por alteração no processo de tradução do RNAm (Ayala et al., 1996; Pirastu et al., 1984; Traeger-Synodinos et al., 1993); - uma mutação no códon de iniciação do gene  $\alpha_1$ , que resulta na substituição de AUG para GUG, alterando o processo de tradução do RNAm deste gene (Moi et al., 1987); - uma deleção

de um dinucleotídeo no códon anterior ao códon de iniciação, que também altera o processo de tradução do RNAm (Morle et al., 1985) e; - uma deleção de um dinucleotídeo na região 3' do exon 1 próximo da junção com o intron 1, produzindo um erro na leitura dos códons, gerando um códon de terminação prematuro ( Safaya et al., 1992).

Outras mutações que causam  $\alpha$ -talassemia também estão relacionadas com hemoglobinas instáveis, sendo elas Hb Quong Sze, Hb Suan Dok, Hb Petah Tikvah, Hb Evaston, Hb Wayne, dentre outras (Honig et al., 1984; Honig et al., 1981; Liebhaber e Kan, 1983; Sanguansermisri et al., 1979; Seid-Akhavan et al., 1976).

#### **1.4.4 Fisiopatologia das $\alpha$ -talassemias**

As conseqüências fisiopatológicas das  $\alpha$ -talassemias são proporcionais ao tamanho do desbalanceamento ocorrido (Naoum et al., 1997). A deficiência de um ou mais genes da  $\alpha$ -globina leva a duas conseqüências imediatas: a diminuição da síntese da hemoglobina e o desequilíbrio entre a produção das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ . A diminuição da síntese da hemoglobina é o maior determinante de hipocromia e microcitose, mais não é clinicamente significativa em heterozigotos. O desequilíbrio entre a produção das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  é um fator mais importante. Na diminuição ou ausência de uma das cadeias das globinas, as cadeias complementares que permanecem com a síntese normal aparecem em excesso e formam agregados entre si, que precipitam no citoplasma, danificam a membrana celular e promovem a destruição prematura das células (Lukens, 1993).

Em indivíduos com  $\alpha$ -talassemia, o defeito na síntese das cadeias tipo  $\alpha$  resulta em um acúmulo de cadeias  $\gamma$  no período fetal e neonatal e de cadeias  $\beta$  no período subsequente. Tetrâmeros de cadeias  $\gamma$  (Hb Bart's) e de cadeias  $\beta$  (Hb H) são instáveis e termolábeis (Scott et al., 1970). As

hemoglobinas Bart's e H são solúveis e não precipitam em grau significativo na medula óssea. Por isto, as  $\alpha$ -talassemias não são caracterizadas por uma eritropoiese ineficiente (Weatherall et al., 1989). A afinidade destas hemoglobinas com o oxigênio é dez vezes maior do que a afinidade da Hb A<sub>1</sub> pelo oxigênio e isto as tornam incapazes de liberar o O<sub>2</sub> para os tecidos em condições fisiológicas. Estas hemoglobinas não apresentam efeito Bohr e não existem evidências de que ocorra a interação heme-heme. A Hb H é facilmente oxidada e tende a precipitar em células mais velhas ( Benesch et al., 1961; Gabuzda, 1966). Assim, a anemia da Doença da Hb H deve-se principalmente ao breve tempo de sobrevivência dos eritrócitos, como consequência da danificação destas células na microcirculação do baço devido a presença dos corpos de inclusão (Weatherall et al., 1989).

#### 1.4.4.1 Características clínicas e laboratoriais

Os estados heterozigotos para  $\alpha^+$ -talassemia ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ), revelam mudanças hematológicas mínimas em adultos, com valores de hemoglobina total (Hb total), hemoglobina corpuscular média (HCM) e volume corpuscular médio (VCM) tipicamente tendendo em direção a média normal inferior. O estado homozigoto para  $\alpha^+$ -talassemia ( $-\alpha/\alpha$ ) e o estado heterozigoto para  $\alpha^0$ -talassemia ( $-/\alpha\alpha$ ) são caracterizados por uma leve anemia microcítica e hipocrômica (Williams et al., 1996). Neste contexto, o indivíduo que apresenta deleção ou mutação em apenas um gene alfa (portador silencioso) é assintomático. Embora apresente VCM discretamente microcítico ( $< 80 \mu^3$ ), a morfologia eritrocitária é geralmente normal com microcitose em algumas células. O portador de traço  $\alpha$ -talassêmico tem como sintomas fraqueza, cansaço, dores nas pernas e palidez. Apresenta microcitose com alterações da morfologia eritrocitária e discreto grau de anemia (Naoum et al.1997).

A doença da Hb H, uma anemia hemolítica crônica, se expressa como uma forma moderadamente grave de talassemia, caracterizada por anemia

microcítica e hipocrômica, associada com o aparecimento de hemoglobina H no sangue periférico, Hb total entre 8 e 11 g/dl e aumento do baço e do fígado (Hall et al., 1993; Naoum et al.1997). De modo geral, esta desordem genética resulta da interação entre talassemias  $\alpha^0$  ( $--$ ) e  $\alpha^+$  ( $-\alpha$ ). Entretanto, esta condição pode ser produzida ou pela combinação de talassemias  $\alpha^0$  com talassemias  $\alpha^+$  não-delecionais ( $\alpha^T\alpha$ ) ou pelo estado homozigoto de defeitos não-delecionais ( $\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$ ) (Fei et al., 1992; Higgs et al., 1991; Paglietti et al., 1986), as quais tendem a serem as formas clinicamente mais severas da Doença da Hb H (Galanello et al., 1983; George et al., 1989; Higgs et al., 1989).

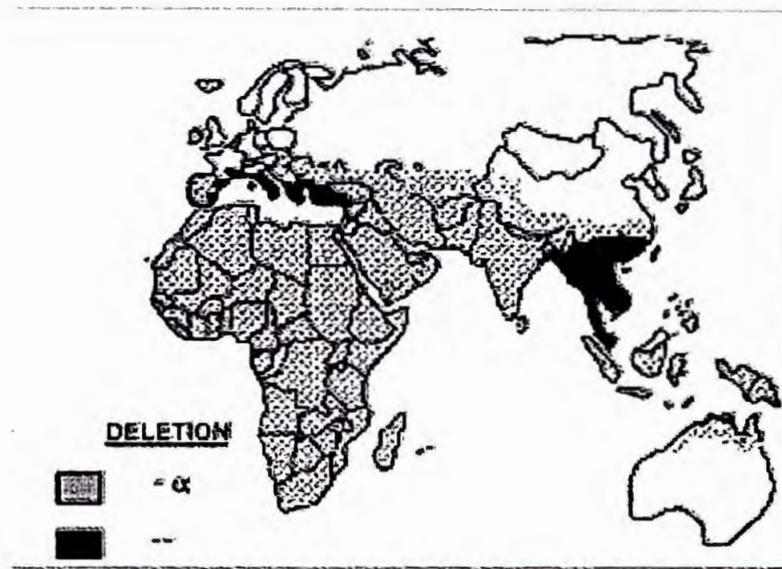
Quanto a Hidropsia fetal, esta é uma condição letal onde o feto morre no útero (23-24 semanas) causando aborto, ao nascer ou em poucos dias após o nascimento (Weatheral et al., 1970). As crianças acometidas por esta talassemia apresentam anemia gravíssima com hemoglobina inferior a 7 g/dl, eritroblastose fetal, edema e baço e fígado bastante aumentados (Naoum et al.1997). Entretanto, foram relatados casos de crianças com Hidropsia fetal, que sobreviveram com auxílio de transfusões intra-uterina e após o nascimento, durante anos (Abuelo et al., 1997; Beaudry et al., 1986; Bianchi et al., 1986; Dame et al., 1999; Lam et al., 1992).

#### **1.4.5 Origem dos genes da $\alpha$ -talassemia**

##### **1.4.5.1 Distribuição geográfica**

Entre as décadas de 1940 e 1950, foram observadas várias doenças que apresentavam características de talassemias. Os estudos da época indicavam uma incidência significativa destas doenças em povos do Mediterrâneo, principalmente Italianos, Gregos e Sul Asiáticos. Este tipo de doença parecia estar presente nos Estados Unidos em indivíduos estrangeiros, principalmente nos Chineses. Outros estudos relataram a incidência desta doença entre os Egípcios, Espanhóis, Portugueses e

Palestinos. Em adição a estas áreas, casos isolados de suposta talassemia envolviam pacientes Argentinos, Brasileiros, Mexicanos, Ingleses, Alemães, Franceses e Negros Americanos. Uma hipótese atrativa para explicar a distribuição da talassemia tão difundida é a migração em massa e o tipo de comércio da época, o que levou o defeito genético do Sul da China para as regiões do Mediterrâneo (Fig. 7) (Chernoff, 1959).



**Figura 7:** Distribuição da  $\alpha$ -talassemia (WEATHERALL ET AL., The metabolic basis of inherited disease. N. York, MacGraw-Hill, 1989, 6a.ed., v. 2, p2327)

A deleção  $-\alpha^{4,2}$  é prevalente em indivíduos da raça Oriental (Lie-Injo et al, 1981) e a deleção  $-\alpha^{3,7}$  apresenta distribuição entre vários grupos raciais, como em indivíduos de origem Mediterrânea, Negra e Oriental (Nienhuis et al., 1984).

As deleções mais comuns encontradas nas regiões do Mediterrâneo são as deleções  $-\alpha^{\text{MED}}$  e  $-\alpha^{20,5}$  (Schilirò et al., 1997) e na região do Oriente é a deleção  $-\alpha^{\text{SEA}}$  (Chang et al., 1991; Chan et al., 1996).

Mais raramente, são encontradas as deleções dos tipos,  $-\alpha^{5,2}$ ,  $-\alpha^{CAL}$  na região do Mediterrâneo (Fortina et al., 1991; Kattamis et al., 1996; Villegas et al., 1994);  $-\alpha^{BRIT}$ , em algumas regiões do Norte da Europa (Higgs et al., 1985) e  $-\alpha^{THAI}$  e  $-\alpha^{FILL}$  no Sudeste da Ásia (Higgs et al., 1999).

A Doença da Hb H é encontrada com maior frequência em regiões tropicais e subtropicais, em populações do Mediterrâneo e do sul da Ásia, onde a  $\alpha$ -talassemia é comum, devido a interações entre vários alelos mutantes (Galanello et al., 1983; Hall et al., 1993).

A  $\alpha^0$ -talassemia homocigota, associada com Hidropsia fetal é um importante problema relacionado com a saúde no Sudeste da Ásia e no Sul da China, onde a  $\alpha$ -talassemia-1 apresenta uma frequência de 3 % (Embury et al., 1979; Winichagoon et al., 1988).

#### 1.4.5.2 Hipótese da malária

A  $\alpha$ -talassemia é a desordem genética mais comum, afetando mais que 80 % em algumas populações (Williams et al., 1996a). J. B. S. Haldane, em 1949, foi o primeiro a propor o conceito da "hipótese da malária". Para isto usou as seguintes palavras:

Os corpúsculos de anêmicos heterocigotos são menores do que o normal e mais resistentes a soluções hipotônicas. É concebível que eles são também mais resistentes aos ataques pelos esporozoos que causam a malária.

Desde então, a malária serve como modelo para o nosso entendimento da seleção natural nos homens. Acredita-se que a malária moldou o genoma humano durante o curso da história da humanidade mais do que qualquer outra doença, deixando rastros que ainda causam dúvidas

com relação a variedade de mecanismos de proteção envolvidos (Mockenhaupt et al., 1999). A correlação geográfica entre talassemias e malária, indicando proteção contra a infecção, é conhecida à algum tempo (Pasvol, 1996; Schrier, 1997).

A  $\alpha$ -talassemia é encontrada nas regiões do mundo onde existe a malária, e pode, por conseguinte, ser levada em consideração conforme o modelo estabelecido para a  $\beta$ -talassemia e anemia falciforme. Entretanto, existem poucas evidências de que a seleção natural devido a malária tenha sido responsável pela distribuição observada da  $\alpha$ -talassemia. A introdução de análises do DNA, tornou possível diagnosticar portadores para a maioria das  $\alpha$ -talassemias. Assim, estudos microepidemiológicos na Melanésia, implicaram fortemente a malária como agente seletivo responsável pela alta prevalência da  $\alpha$ -talassemia em regiões tropicais e subtropicais (Flint et al., 1966).

Um estudo evidenciando a epidemiologia da malária em crianças, efetuado em Vanuatu (Ilha localizada no sudoeste do Oceano Pacífico - Melanesia), reportou que a incidência da malária sem complicações clínicas e sem prevalência de esplenomegalia, que pode ser considerado um índice de infecção por malária, é significativamente mais alta em crianças com  $\alpha$ -talassemia do que em crianças normais. Além disto, este efeito é mais marcante em crianças mais jovens e com relação ao parasita não letal *P. vivax*. A  $\alpha$ -talassemia pode ter apresentado efeito benéfico por aumentar a suscetibilidade para o *P. vivax*, o qual age como uma vacina natural nesta comunidade, induzindo limitada proteção intra-espécies contra o *P. falciparum*, que é um agente mais severo para desenvolvimento da doença (Williams et al., 1996a).

Outra hipótese sugere que células  $\alpha$  e  $\beta$ -talassêmicas parasitadas, de indivíduos que vivem em áreas endêmicas de malária, apresentam uma

quantidade maior de anticorpos do que as células dos indivíduos controle (Luzzi et al, 1991). Esta observação fornece uma explicação plausível de proteção se a opsonização mediada por anticorpos e conseqüente remoção prematura de células infectadas for considerado um dos maiores mecanismos de proteção contra a malária (Pasvol, 1996).

Alguns estudos mostram que a incidência de talassemia em regiões livre de malária é baixa quando comparada com regiões endêmicas para a malária (Siniscalco et al., 1966).

Mesmo existindo várias teorias para a "hipótese da malária", no fim do século 20 ainda não existem medidas fidedignas *in vitro* que esclareçam o mecanismo de proteção imunológica contra o malária com relação a  $\alpha$ -talassemia (Pasvol, 1996).

#### 1.4.6 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial da  $\alpha$  - talassemia é de grande importância para caracterizar uma anormalidade hematológica como discreta anemia microcítica ou microcitose, que são achados hematológicos comuns, usualmente relacionados com a deficiência de ferro ou  $\beta$ -talassemia. Quando estas duas condições são excluídas, a  $\alpha$ -talassemia deve ser considerada no diagnóstico diferencial (Mach-Pascual et al., 1996).

As  $\alpha$ -talassemias clinicamente significativas, que resultam das deleções de três ou quatro genes, normalmente não apresentam dificuldades de serem diagnosticadas devido a sinais (clínicos e morfológicos dos eritrócitos) característicos. Entretanto, diagnósticos para doenças subclínicas causadas pela deleção de um ou dois genes não ocorre com a mesma facilidade e ainda hoje são diagnosticadas através de *Southern Blot* (Boriello et al., 1994).

Os índices hematimétricos descritos no hemograma são de grande importância para esta triagem, suplementados pela determinação da concentração de Hb A<sub>2</sub> com a finalidade de se excluir o traço β - talassêmico quando o HCM está significativamente reduzido (< 25pg). Cabe salientar que a presença de traço β - talassêmico não exclui a possibilidade de existir a α - talassemia (Sivera et al., 1997, Bain et al., 1998). Em adição ao hemograma, usa-se a contagem de reticulócitos e pesquisa de corpos de Hb H intra - eritrocitária (Naoum e Domingos., 1998).

Quando é detectado a presença da microcitose com ou sem hipocromia são efetuadas determinações de ferro sérico, da capacidade total de fixação do ferro no soro, da ferritina e saturação de ferro. Pode se fazer também a eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose pH 8,6, onde a Hb H é diferenciada das hemoglobinas normais ( Hb A<sub>1</sub>, Hb A<sub>2</sub> e Hb F) por apresentar mobilidade eletroforética maior do que as demais (Babior e Stossel, 1994).

Muitas vezes os testes hematológicos e bioquímicos normalmente efetuados, disponíveis nos laboratórios de hematologia, não são capazes de diagnosticar com segurança o traço α-talassêmico em portadores que apresentam um ou dois genes inativos, mesmo que se obtenha resultados positivos de Hb H para pelo menos um dos testes e ainda não informam o tipo de α - talassemia (Sivera et al., 1997, Bain et al., 1998).

#### **1.4.6.1 A técnica da PCR (Reação em cadeia da polimerase)**

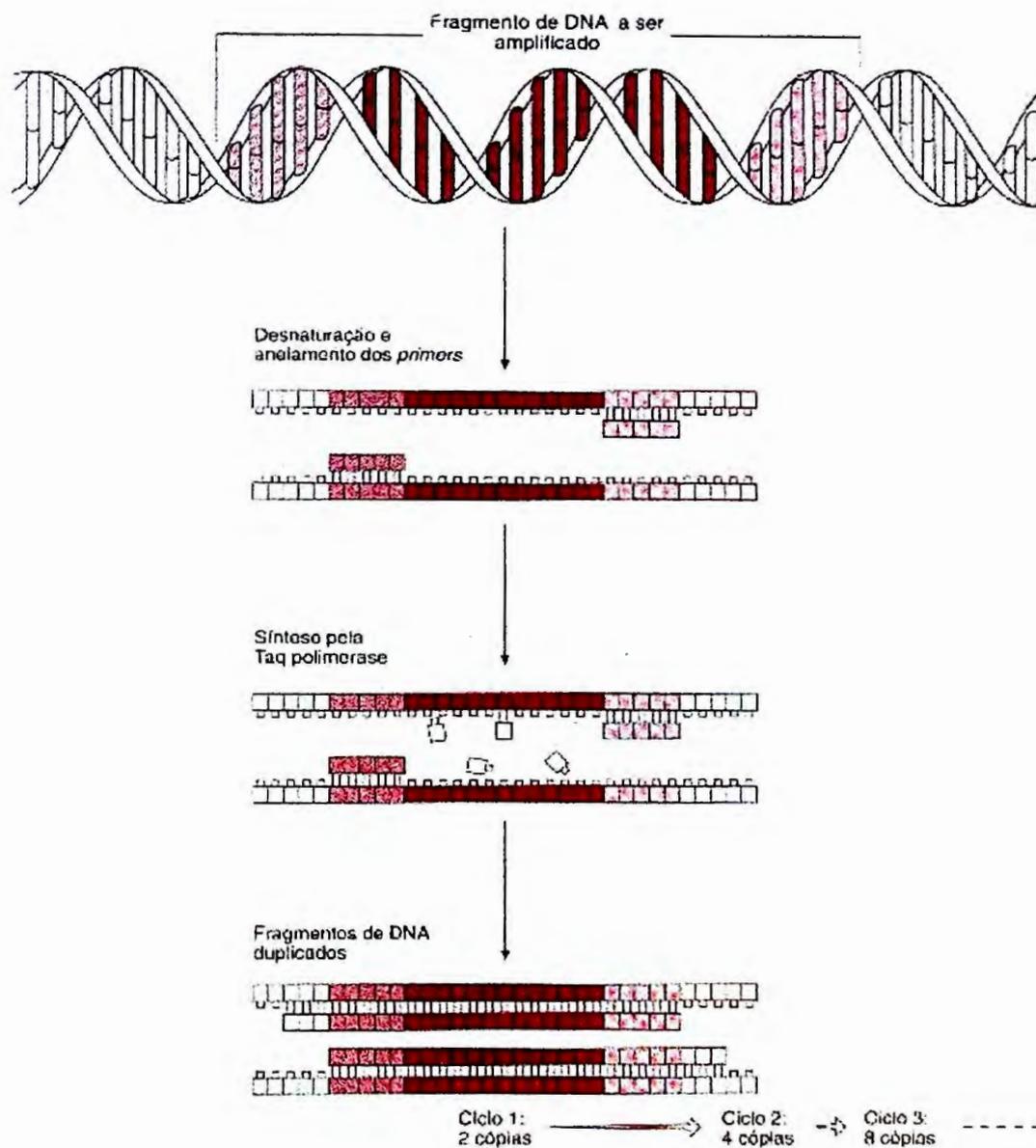
Com o advento das técnicas de biologia molecular foi possível a caracterização e identificação do tipo de α-talassemia. Estes resultados são de extrema importância, uma vez que a complexidade da doença depende de quantos genes estão ausentes ou com a expressão diminuída. Além disto, as técnicas de biologia molecular fornecem subsídios para a detecção de portadores assintomáticos, podendo contribuir para a pesquisa,

---

aconselhamento genético e a escolha de uma terapêutica específica eficiente quando necessário.

A técnica da PCR (*polymerase chain reaction*) permite amplificar seqüências selecionadas de DNA, com a utilização de *primers* consistindo de dois oligonucleotídeos (Reddy e Bowie, 1997).

Sob condições ideais de força iônica e temperatura, dois *primers* complementares às fitas opostas do DNA molde são especificamente hibridizados ao DNA molde e utilizados para iniciar a síntese de DNA *in vitro* com o auxílio da DNA polimerase termoestável. As condições de anelamento e síntese da extensão do DNA são cuidadosamente controladas, limitando a síntese do DNA à seqüência localizada entre os dois *primers*. Após o anelamento os *primers* são polimerizados, gerando uma nova cópia da seqüência molde localizada entre estes dois oligonucleotídeos (Fig. 8, pág. 26). Quando a extensão do *primer* é completada, o DNA duplex é desnaturado pelo aquecimento da amostra por alguns segundos, regenerando aproximadamente duas vezes mais o número inicial de fitas simples utilizadas como molde para o anelamento do par de *primer* no próximo ciclo. Assim, uma série de ciclos é realizada, durante os quais o DNA molde é desnaturado, os primers especificamente anelados e extensos com o auxílio da DNA polimerase termoestável em cada ciclo (Davis et al., 1994).



**Figura 8:** Esquema da "Reação em cadeia da polimerase". Cada ciclo consiste de desnaturação da fita molde, anelamento dos *primers* em cada fita alvo complementar e síntese da seqüência entre os *primers* (Farah, DNA: Segredos e Mistérios, Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda, 1997, p.123).

#### 1.4.7 Mutação estudada

Sabe-se da existência de centenas de mutações que acometem os genes responsáveis pela produção das cadeias das  $\alpha$ -globinas. Entretanto, a maioria destas mutações são específicas de certas populações e um tanto quanto raras. No presente trabalho, foi estudada a deleção  $-\alpha^{3,7}$  (Fig. 6, pág. 15).

A deleção  $-\alpha^{3,7}$  foi escolhida por ser a forma mais comum encontrada nas  $\alpha^+$ -talassemias e por ser observada em todas as partes do mundo. Optou-se por determinar o sítio que compreende a região 5' do gene  $\theta_1$  como controle dos resultados obtidos. A população brasileira é composta praticamente da mistura de raças provenientes do continente Europeu. Dentre estas raças européias estão os povos italianos, portugueses e espanhóis, onde se encontram a deleção  $-\alpha^{3,7}$  com frequência (Foglietta et al., 1996; Kattamis et al., 1996; Sonati et al., 1992; Velati et al., 1986; Zago et al., 1983), cujo número de descendentes no Brasil é bastante significativo.

Segundo a literatura, parte da população negra do Brasil é aparentemente diferente daquelas da América do Norte, Jamaica e África. Existe uma mistura maior com europeus, como indicado pela grande quantidade de pacientes classificados como mulatos. Mesmo em negros encontra-se a deleção  $-\alpha^{3,7}$  (Sonati et al., 1992; Zago et al., 1985).

## **Objetivos**

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- Identificar a deleção  $-\alpha^{3,7}$  no agrupamento de genes que codificam as  $\alpha$ -globinas em indivíduos com microcitose e hipocromia não esclarecidas, utilizando a técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase);
  - Avaliar esta técnica quanto ao auxílio diagnóstico do portador silencioso e do traço  $\alpha$  - talassêmico.
-

## **Material e métodos**

---

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Casuística**

Foram triados pelo Ambulatório de Anemias do Serviço de Hematologia e Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo dentre 7200 pacientes, que passaram pelo ambulatório no período de 1996 a 1998, 23 pacientes com idades entre 3 e 63 anos, apresentando microcitose e hipocromia sem deficiência de ferro. Foram obtidos os consentimentos livre e informado dos pacientes ou de seus representantes legais para a utilização de suas amostras no presente estudo.

No prontuário de cada paciente foram coletados dados de análises laboratoriais tais como hemograma completo (Cell-Dyn<sup>®</sup> 3000 ABBOTT - Unipath Corp., Mountain View, CA), contagem de reticulócitos (método de "Azul de cresil brilhante" 1 %), investigação intra-eritrocitária de hemoglobina H (método de "Azul de cresil brilhante" 1 %), eletroforese de hemoglobina em pH alcalino 8,6 e quantificação da Hb A<sub>2</sub> (Dacie e Lewis, 1984), quantificação da Hb F [método de Betke modificado (Dacie e Lewis, 1984)], determinação de ferro sérico [método da batofenantrolina modificado (Maspes et al., 1982)], capacidade total de fixação de ferro do soro (Maspes et al., 1982), saturação da transferrina e ferritina (método imunoenzimático (ELISA) com a utilização de kit fabricado pela Dade / Baxter Inc., Miami, USA) ) (Tab. 2, pág. 33). Estas análises foram efetuadas pelo Laboratório de Hematologia do Serviço de Hematologia e Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo. As amostras de DNA

destes pacientes foram analisadas para a detecção da deleção  $-\alpha^{3,7}$ , que acomete o agrupamento de genes responsáveis pela produção das cadeias das  $\alpha$ -globinas.

**Tabela 2:** Dados dos pacientes, eritrograma, percentual de hemoglobinas, pesquisa de Hb H e perfil do ferro.

P	Idade anos	S	E	Hb g/dl	Ht %	VCM $\mu^3$	HCM pg	CHCM g/dl	RDW %	Ret %	Hb A1 %	Hb A2 %	Hb F %	Hb H cel.	Ferro $\mu\text{g/dl}$	CTFF $\mu\text{g/dl}$	Ferrit ng/ml	Sat %
1	29	M	4,87	12,1	36,3	75,0	24,8	33,3	ND	0,1	> 95	< 5	< 1	20	70	302	78	23
2	11	F	3,75	9,6	28,0	78,9	27,0	34,3	15,6	0,2	97,1	2,4	0,5	N	86	295	ND	29
3	3	F	4,30	11,7	35,6	83,0	27,0	32,0	13,0	0,2	96,5	2,5	1,0	0,9*	74	266	29	27
4	31	F	5,38	12,7	41,0	76,3	23,6	30,9	14,5	ND	96,9	2,4	0,7	N	72	340	32	21
5	30	M	6,22	13,9	46,1	74,2	22,4	30,2	15,0	ND	96,0	3,4	0,6	1	98	321	209	30
6	11	M	6,58	13,2	42,4	64,5	20,1	31,2	39,0	ND	> 95	< 5	< 1	N	110	423	ND	26
7	24	M	5,53	12,4	38,5	69,6	22,4	32,2	13,9	0,1	95,7	3,2	1,1	N	87	292	ND	30
8	15	M	4,88	12,1	37,4	76,6	24,8	32,4	13,8	1,2	96,4	3,0	0,6	N	98	481	61	20
9	45	F	5,52	13,6	41,5	75,1	24,6	32,8	14,9	0,1	97,2	2,3	0,5	N	96	301	ND	30
10	48	F	4,29	10,4	32,1	74,7	24,1	32,3	16,3	0,6	97,9	2,0	0,1	N	87	384	19	23
11	38	F	4,30	11,9	36,1	79,9	27,7	33,0	13,1	1,4	95,6	3,3	1,1	N	107	249	54	42
12	42	F	5,48	13,7	42,1	76,8	25,0	32,5	16,4	0,2	95,9	2,9	1,2	N	39	308	32	13
13	50	F	5,82	13,0	41,3	71,0	22,3	31,5	14,8	1,0	> 95	< 5	< 1	N	122	333	20	37
14	63	M	5,96	14,2	45,5	76,2	23,8	31,3	15,8	0,3	96,2	3,2	0,6	N	94	206	224	41
15	57	F	5,42	13,0	38,8	71,7	24,0	33,5	16,0	ND	96,5	2,6	0,9	7	89	303	16	29
16	82	F	5,30	11,7	37,7	71,1	22,1	31,1	16,3	ND	96,5	3,0	0,5	N	72	291	20	25
17	25	F	4,72	11,7	36,8	78,0	24,8	31,8	ND	0,2	96,7	2,9	0,4	3	91	433	17	21
18	57	F	4,68	12,0	36,4	77,8	25,5	32,8	14,6	ND	95,9	2,7	1,4	N	94	384	176	24
19	14	M	5,08	13,1	38,7	76,2	25,8	33,9	13,8	0,2	> 95	< 5	< 1	1	114	ND	ND	ND
20	F	5,81	13,8	43,1	74,2	23,6	32,0	14,8	1,0	95,9	2,9	1,2	N	92	357	ND	26	
21	16	F	3,99	10,1	39,0	77,4	25,2	32,6	14,8	1,5	96,5	3,0	0,5	2	106	437	12	24
22	15	F	4,99	12,0	37,3	74,7	24,0	32,1	13,7	1,4	95,2	3,1	1,7	N	95	243	ND	39
23	12	M	3,96	11,0	33,2	79,9	27,8	33,1	13,0	ND	> 95	< 5	< 1	N	59	337	ND	17

**Legenda:** P: Pacientes, S: Sexo, E: Eritrócitos ( $10^6/\text{mm}^3$ ) Hb: hemoglobina, Ht: hematócrito, VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: concentração da hemoglobina corpuscular média, RDW (*Red Cell Distribution Width*): Amplitude da distribuição das hemácias (ADH), Ret.: reticulócitos, CTFF: capacidade total fixação do ferro, Ferrit.: ferritina, Sat.: Saturação do ferro./ F: sexo feminino, M: sexo masculino/ N = não foi encontrado Hb H em lâmina/ \* fração H (eletroforese) ND: não determinado. **Valores normais:** Eritrócitos ( $10^6/\text{mm}^3$ ): F: 4,0 – 5,4, M: 4,4 – 5,9/ Hb (g/dl): F: 12 – 16, M: 13 – 18/ Ht (%): F: 35 – 47, M: 40-52/ VCM ( $\mu^3$ ): 80 – 100/ HCM (pg): 27 – 32/ CHCM (g/dl): 32 – 37/ RDW (%): 11,6 – 14,8/ Reticulócitos (%): 0,5 – 1,5/ Hb A1 (%): 95,0 – 98,0/ Hb A2 (%): 2,0 - 3,5/ Hb F (%): < 3,0/ Hb H: nenhuma célula/ Ferro ( $\mu\text{g/dl}$ ): 75 – 135/ CTFF ( $\mu\text{g/dl}$ ): 250 – 350/ Ferritina (ng/ml): F: 6 – 186, M: 32 – 284/ Saturação (%): 20 – 30.

**Nota:** Dados obtidos através da consulta aos prontuários dos pacientes.

## 3.2 Materiais

### 3.2.1 Reagentes

#### 3.2.1.1 Extração do DNA genômico

O cloreto de sódio, o cloreto de potássio, o etanol absoluto e o ácido clorídrico fumegante foram obtidos da MERCK, S.A. (Ind. Química, R. J., Brasil); o hidróxido de sódio foi obtido da CARQ (Cromato Produtos Químicos Ltda, SP, Brasil), o cloreto de magnésio foi obtido da SIGMA Chemical Co. (St. Louis, MO, Estados Unidos), o Tris (hidróximetil) aminometano ultrapuro e o EDTA foram obtidos da GIBCO BRL, Life technologies, Inc. ( Gaithersburg, MD, Estados Unidos), o dodecilsulfato de sódio foi obtido da SERVA Feinbiochemica, Heidelberg, (N. Y., Estados Unidos) e o Triton X-100 foi obtido da Rohm & Haas Co. (Estados Unidos).

#### 3.2.1.2 Reação em cadeia da polimerase

Os iniciadores (*primers*) foram obtidos da GIBCO BRL, Life technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, Estados Unidos), as soluções de dNTPs ultrapura (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e o cloreto de magnésio 25 mM foram obtidos da PHARMACIA Biotech, Inc. (Uppsala, Suécia); a *Taq* DNA polimerase 250 U e o tampão da reação 10x concentrado foram obtidos da BIOTOOLS UNISCIENCE do Brasil (SP, Brasil); a *KlenTaq1* DNA polimerase 25 – 30 U/ $\mu$ l, com capacidade para amplificar fragmentos maiores que 1500 bp foi obtida da Ab Peptides, Inc. (St. Louis, MO, USA) e o DMSO foi obtido da SIGMA Chemical Co. (St. Louis, MO, Estados Unidos).

#### 3.2.1.3 Eletroforese e revelação

A agarose ultrapura, o ácido bórico ultrapuro, o Tris-base ultrapuro, o EDTA ultrapuro e o marcador de tamanho molecular de 100 bp foram

obtidos da GIBCO BRL, Life technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, Estados Unidos), o hidróxido de sódio foi obtido da CARQ (Cromato Produtos Químicos Ltda, SP, Brasil), o brometo de etídeo e o marcador de tamanho molecular de 1 Kb foram obtidos da PHARMACIA Biotech, Inc. (Uppsala, Suécia), o azul de bromofenol foi obtido da BIO-RAD Laboratories, Inc. (Hércules, CA, Estados Unidos), o xilenocianol-FF da Fluka Chemie AG (Suíça) e o glicerol foram obtidos da MERCK, S.A. (Ind. Química, R. J., Brasil).

### **3.2.2 Amostras biológicas**

As amostras de sangue dos pacientes foram colhidas através de punção venosa, através da utilização do sistema de coleta a vácuo (Vacuntainer BD, São Paulo, Brasil). Coletou-se aproximadamente 5 ml de sangue em tubos contendo EDTA como anticoagulante. A amostra foi utilizada inicialmente para a realização do hemograma, contagem de reticulócitos e eletroforese de hemoglobinas. Uma alíquota de 1 ml de sangue total foi retirada e acondicionada em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml para a extração do DNA. As amostras para as determinações séricas do ferro, ferritina e capacidade total de fixação de ferro do soro, foram coletadas em tubos sem anticoagulante.

## **3.3 Métodos**

### **3.3.1 Determinação da deleção $-\alpha^{3,7}$ no agrupamento de genes da $\alpha$ -globina.**

#### **3.3.1.1 Extração do DNA genômico**

Utilizou-se aproximadamente 1 ml de sangue total acondicionado em tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Centrifugou-se a 5000 rpm por 5 minutos e em temperatura ambiente, em centrífuga tipo *Eppendorf*, modelo 5415C (Brinkmann Instruments, Inc., Westburg, Alemanha). Removeu-se o

---

sobrenadante e acrescentou-se 0,9 ml de tampão TM1 (Tris-HCl 10mM pH 7,6; KCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM e EDTA 2 mM) contendo Triton X-100 a 2,75 %. Homogeneizou-se por inversão várias vezes e centrifugou-se a 5000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente, em centrífuga tipo *Eppendorf*. Desprezou-se o sobrenadante. Repetiu-se este procedimento por mais duas vezes com TM1. Este procedimento foi repetido quantas vezes foi necessário até que o sedimento se tornasse livre de pigmento hemoglobínico. Adicionou-se neste sedimento 0,2 ml de tampão TM2 [(Tris-HCl 10 mM pH 7,6; KCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EDTA 2 mM, NaCl 0,4 mM e 20 µl de dodecilsulfato de sódio a 10 % (SDS)]. Agitou-se levemente com pipeta automática e incubou-se em banho de água a 56°C por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 60 µl de NaCl 5 M, agitou-se vigorosamente e centrifugou-se a 12000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente, em centrífuga tipo *Eppendorf*. O sobrenadante foi transferido para um tubo de centrífuga de 1,5 ml e neste adicionou-se dois volumes de etanol absoluto gelado. Homogeneizou-se por inversão várias vezes para a precipitação do DNA (nesta solução o DNA pode ser guardada em geladeira por validade indeterminada). Centrifugou-se novamente a 12000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente, em centrífuga tipo *Eppendorf*. Descartou-se o sobrenadante. Lavou-se o precipitado duas vezes com etanol 70 % gelado e repetiu-se mais uma vez a centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente, em centrífuga tipo *Eppendorf*. Desprezou-se o sobrenadante e o DNA precipitado secou a temperatura ambiente até completa evaporação do etanol. Posteriormente, adicionou-se ao precipitado 100 µl de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 e EDTA 1 mM pH 8,0.). Homogeneizou-se levemente. Incubou-se em banho de água a 56° C por 15 minutos antes de ser utilizado para a reação da PCR.

### **3.3.1.2 Dosagem e confirmação da extração do DNA genômico**

Para confirmação da extração do DNA genômico efetuou-se eletroforese em gel de agarose a 1 % com tampão TBE (Tris-HCl 0,45 mM,

ácido bórico 0,45 mM e EDTA 2,5 mM) contendo 0,5 µl de brometo de etídeo 10 mg/ml, em uma cuba eletroforética da GIBCO BRL, Life Technologies Inc. (Gaithersburg, MD, Estados Unidos). Adicionou-se na cuba tampão TBE para imersão do gel e aplicou-se 8 µl das amostras sendo, 5 µl de DNA dissolvido e 3 µl de tampão de aplicação *Loading-buffer* (azul de bromofenol 0,25 %, xilenocianol-FF 0,25 % e glicerol 30 %). Simultaneamente aplicou-se um marcador de tamanho molecular de DNA de 1 Kb (PHARMACIA Biotech, Inc., Uppsala, Suécia). Efetuou-se a separação eletroforética a 100 volts. por 30 minutos, utilizando fonte modelo EPS 200, Pharmacia LKB (Uppsala, Suécia). Visibilizou-se as bandas de DNA em transiluminador UV (Macrovue, Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia).

Determinou-se a concentração do DNA através de espectrofotometria em UV (Espectrofotômetro Beckman DU Modelo 640, Palo Alto, CA., USA). Diluiu-se 1:50 a solução contendo DNA em tampão TE e efetuou-se a leitura em comprimento de onda a 260 e 280 nm. A concentração de DNA foi ajustada em aproximadamente 100 ng/µl para utilização em reação da PCR.

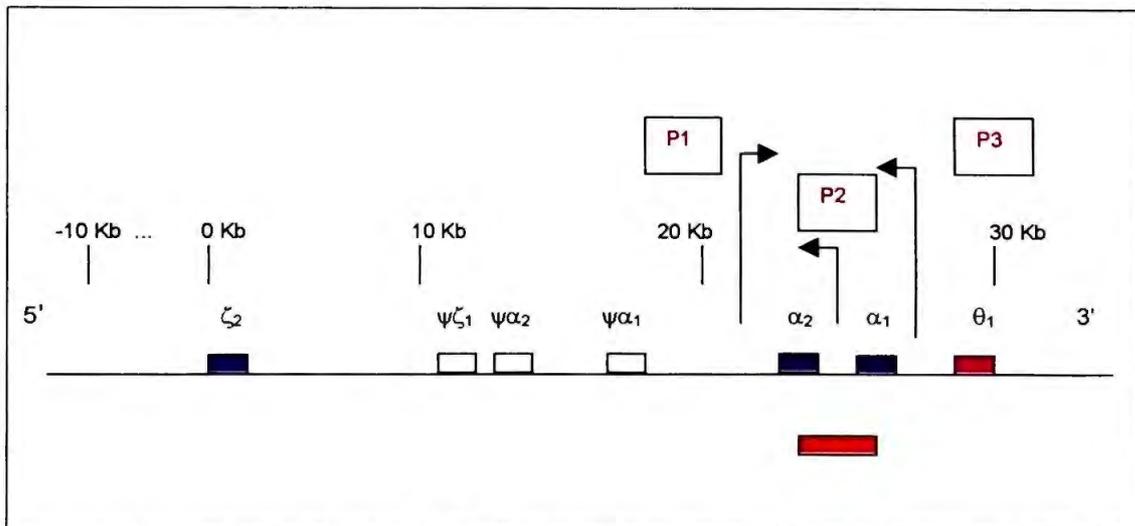
### 3.3.1.3 Amplificação *in vitro* do DNA pela técnica da PCR

#### 3.3.1.3.1 Otimização da amplificação de fragmentos do DNA para detecção da deleção $\alpha^{3,7}$

Para pesquisar a deleção  $\alpha^{3,7}$  foram utilizados os seguintes *primers* obtidos da GIBCO-BRL, Life technologies, Inc. ( Gaithersburg, MD, Estados Unidos):

- P1 - 5' - CCC TCC CCC TCg CCA AgT CCA CCC C - 3',
- P2 - 5' - ggg Agg CCC ATC ggg Cag gAg gAA C - 3' e
- P3 - 5' - ggg ggg Agg CCC Aag ggg CAA gAA - 3'.

O produto da amplificação gênica tanto para a deleção  $-\alpha^{3,7}$  como para o gene  $\alpha_2$  normal é de 1,76 Kb (Tab. 4). O *primer* comum P1 *sense* posiciona-se na região promotora +5671 - +5695 do gene  $\alpha_2$ . O *primer antisense* P2, que caracteriza o gene  $\alpha_2$  normal localiza-se na posição +7431 - +7409, na região 3' UTR do gene  $\alpha_2$  e o *primer antisense* P3, que caracteriza a deleção  $-\alpha^{3,7}$  está localizado na posição +11254 - +11231, na região 3' UTR do gene  $\alpha_1$  (Fig. 9). Assim, a amplificação dos *primers* P1 e P2 mostra que o gene  $\alpha_2$  está normal e a amplificação dos *primers* P1 e P3 mostra que existe a deleção. (Smetanina e Huisman, 1996).



**Figura 9:** Diagrama da deleção  $-\alpha^{3,7}$  e localização dos primers utilizados. Os genes funcionais estão representados por retângulos preenchidos de azul. O retângulo vermelho indica a extensão da deleção. As localizações dos *primers* estão indicadas por linhas verticais e suas direções por setas. O par de *primers* P1/P2 amplifica o segmento normal. O par de *primers* P1/P3 amplifica o segmento que identifica a deleção  $-\alpha^{3,7}$ .

Foram testadas as concentrações de 1,5 a 3,0 mM de cloreto de magnésio, para a amplificação dos fragmentos contidos no agrupamento dos genes que codificam as  $\alpha$ -globina utilizando-se os *primers* P1/P2 e P1/P3. Foi avaliada a necessidade da adição de um desnaturante, o DMSO, nas concentrações de 7,0 e 10,0%. Os testes foram avaliados nas temperaturas de hibridação de 58 °C a 68 °C.

Para demonstrar a presença do genótipo  $-\alpha^{3,7}$ , duas reações separadas correram simultaneamente para cada amostra de DNA. Uma reação continha o par de primer que amplifica um segmento do cromossomo com a deleção (P1/P3), consistindo das seqüências 5' e 3' desta deleção (Fig. 9, pág.37), enquanto o outro par de primer (P1/P2) amplifica o fragmento que caracteriza o gene  $\alpha_2$  normal. O desenho de cada *primer* reverso é baseado nas divergências das seqüências entre os genes  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ .

Assim sendo, o DNA genômico ( $\approx 100$  ng /  $\mu$ l), foi submetido a amplificação pela técnica da PCR onde foi utilizado 1,5 U de *KlenTaq1* DNA polimerase 25 – 30 U/ $\mu$ l, com capacidade para amplificar fragmentos maiores que 1500 bp (Ab Peptides, Inc, St. Louis, MO, USA). A mistura da reação (50  $\mu$ l) continha 20 pM dos *primers* que flanqueavam as regiões de interesse (P1/P2, P1/P3), 5  $\mu$ l do tampão da reação 10x concentrado (Ab Peptides, Inc, St. Louis, MO, USA) e 200 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP (PHARMACIA Biotech, Inc., Uppsala, Suécia). Foi padronizado a utilização de 3,5  $\mu$ l de DMSO (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos). O procedimento para amplificação foi efetuado em termociclador de DNA (Progene, Unicidade, SP, Brasil). Um total de 30 ciclos de amplificação foram efetuados sob as condições descritas nas tabelas 3.

**Tabela 3:** *Primers* 1, 2 e 3. Programa para amplificação dos locais que flanqueiam as regiões 5' e 3' dos genes  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ , respectivamente (P1 e P2) e do local que flanqueia a região 5' e 3' do gene  $\alpha_2$  (P1 e P3).

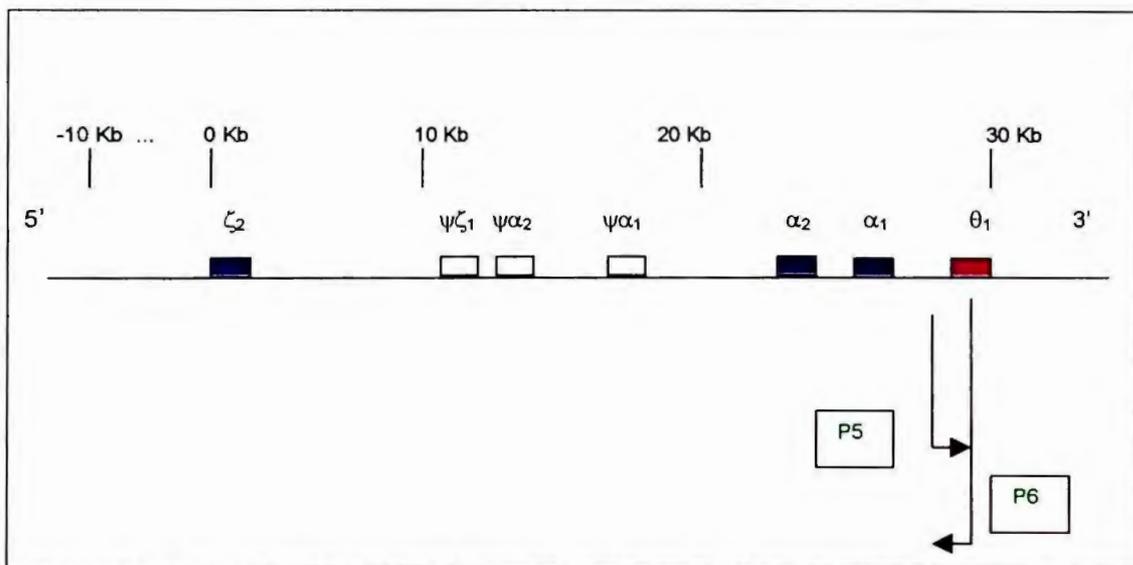
AMPLIFICAÇÃO	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (min)
Desnaturação Inicial	96	5
Desnaturação	95	1
Anelamento	68	1
Extensão	72	2
Extensão final	72	10

### 3.3.1.3.2 Otimização da amplificação do fragmento do DNA que flanqueia a região 5' do gene $\theta_1$

Os *primers* utilizados para a detecção do fragmento que flanqueia a região 5' do gene  $\theta_1$  foram sintetizados pela GIBCO-BRL, Life technologies, Inc. ( Gaithersburg, MD, Estados Unidos), sendo eles:

- P5 - 5' - TAC AgC AgA gTg AgT gCT gCA T - 3' e
- P6 - 5' – ggA gAA gTA ggT CTT CgT ggC - 3'.

O produto da amplificação gênica para este fragmento é de 1000bp (Bowden et al., 1992; Bowie et al., 1994).



**Figura 10:** Diagrama ilustrando os locais que flanqueiam a região 5' do gene  $\theta_1$  e a localização dos *primers* utilizados. Os retângulos preenchidos em azul representam os genes funcionais. Os retângulos sem preenchimento representam os pseudogenes. A localização dos *primers* estão indicadas por linhas verticais e suas direções por setas.

Foram testadas as concentrações de 1,5 a 3,0 mM de cloreto de magnésio, para a amplificação do fragmento contido no agrupamento dos genes que codificam as  $\alpha$ -globina utilizando-se os *primers* P5/P6. Foi avaliada também a necessidade da adição de um desnaturante, o DMSO,

nas concentrações de 7,0 e 10,0%. Os testes foram avaliados em três temperaturas de hibridação, sendo elas 55, 56 e 57 °C.

O DNA genômico ( $\approx 100 \text{ ng} / \mu\text{l}$ ), foi submetido a amplificação pela técnica da PCR utilizando-se 2,5 U de *Taq* DNA polimerase 250 U (BIOTOOLS, UNISCIENCE do Brasil, SP, Brasil). A mistura da reação (50  $\mu\text{l}$ ) continha 20 pM dos *primers* que flanqueavam as regiões de interesse (P5/P6), 5  $\mu\text{l}$  do tampão da reação 10x concentrado (BIOTOOLS, UNISCIENCE do Brasil, SP, Brasil) e 200 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP (PHARMACIA Biotech, Inc., Uppsala, Suécia). Padronizou-se a utilização de 2,6  $\mu\text{l}$  de cloreto de magnésio 25 mM (PHARMACIA Biotech, Inc., Uppsala, Suécia) e 3,5  $\mu\text{l}$  de DMSO (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos). O procedimento para amplificação foi efetuado em termociclador de DNA (Progene, Uniciencia, SP, Brasil). Um total de 30 ciclos de amplificação foram efetuados sob as condições descritas nas tabelas 4.

**Tabela 4:** *Primers* 5 e 6. Programa para amplificação dos locais que flanqueiam a região 5' do gene  $\theta_1$ .

AMPLIFICAÇÃO	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (min)
Desnaturação inicial	96	5
Desnaturação	95	1
Anelamento	57	2
Extensão	72	2
Extensão final	72	10

#### 3.3.1.4 Análise dos produtos amplificados

Os produtos da PCR obtidos através da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1 % em tampão TBE (Tris-HCl 0,45 mM, ácido bórico 0,45 mM e EDTA 2,5 mM) contendo 0,5  $\mu\text{l}$  de brometo de etídeo, em uma cuba eletroforética da GIBCO BRL, Life Technologies Inc.

(Gaithersburg, MD, Estados Unidos). Aplicou-se 12  $\mu$ l das amostras, sendo 10  $\mu$ l do produto da PCR adicionado de 2  $\mu$ l de tampão de aplicação (*Loading-buffer*), composto por azul de bromofenol 0,25 %, xilenocianol-FF 0,25 % e glicerol 30 %. Simultaneamente aplicou-se um marcador de tamanho molecular de DNA de 1Kb para os pares de *primers* P1/P2 e P2/P3 (PHARMACIA Biotech, Inc., Uppsala, Suécia) e 100 bp para o par de *primer* P5/P6 (GIBCO BRL, Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos). Efetuou-se a separação eletroforética a 100 volts por 35 minutos, utilizando fonte Pharmacia LKB, modelo EPS 200 (Uppsala, Suécia). Os fragmentos de DNA (Tab. 5) foram visibilizados em transiluminador UV (Macrovue, Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia).

**Tabela 5:** Fragmentos dos produtos de amplificação pela PCR em pares de bases, utilizando-se *primers* que flanqueiam a região de interesse.

PRIMERS	PRODUTO DA PCR	TAMANHO DO FRAGMENTO DA PCR
P1 e P2	Gene $\alpha_2$ normal	1760 bp
P2 e P3	Deleção $-\alpha^{3,7}$	1760 bp
P5 e P6	Região 5' do gene $\theta_1$	1000 bp

## **Resultados**

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Otimização da PCR.

#### 4.1.1 Avaliação da concentração de cloreto de magnésio, temperatura de hibridação e adição de desnaturante químico.

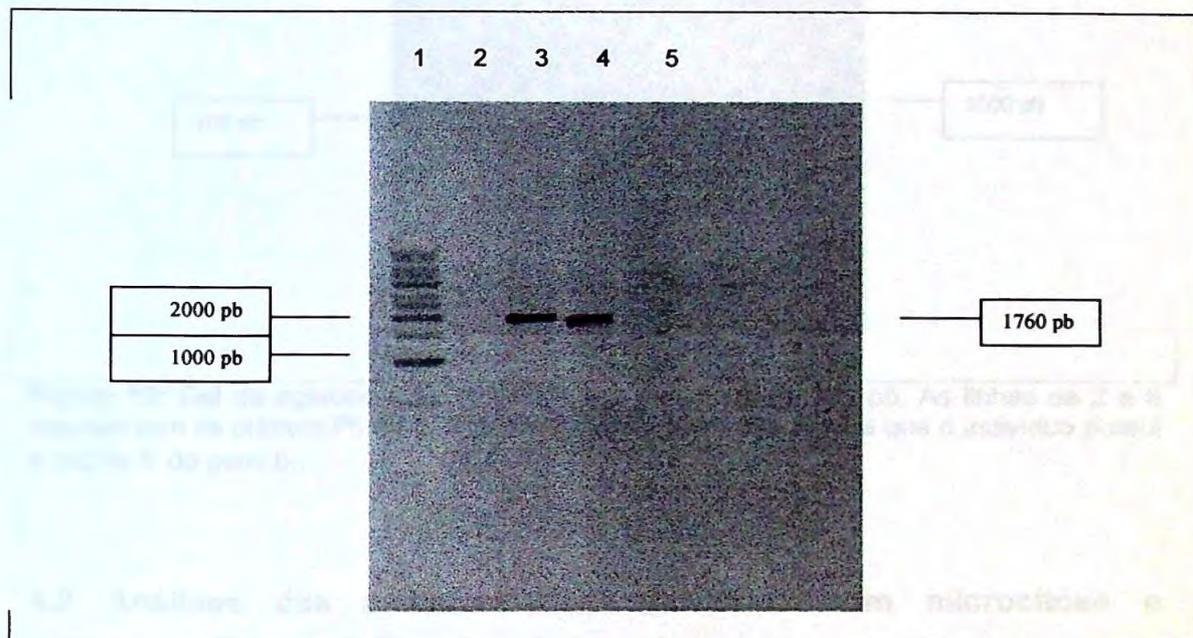
Para os *primers* P1/P2 e P1/P3, os quais avaliam a deleção  $\alpha^{3,7}$ , verificou-se que a concentração do cloreto de magnésio ideal foi a de 1,5 mM (Fig. 11, pág. 44), mas apenas com adição de 7,0% de DMSO, na temperatura de hibridação de 68°C. A concentração de cloreto de magnésio de 3,0 mM foi inadequada apresentando bandas inespecíficas (resultados não mostrados). As temperaturas de hibridação testadas de 58 a 67°C, não apresentaram amplificação do fragmento de interesse.

Quando se observou a presença do fragmento de 1760 pb para os *primers* P1 e P2 pode-se determinar o gene  $\alpha_2$  normal. A ausência deste fragmento para estes primers determina que o gene  $\alpha_2$  está comprometido. Os *primers* P1 e P3 também fornecem fragmentos de 1760 pb, onde a amplificação deste fragmento representa a deleção (Fig. 11, pág. 44).

Mesmo com a concentração de cloreto de magnésio de 1,5 mM, com a adição de 7,0 % de DMSO e t°C de hibridização de 68°C, só houve a amplificação do fragmento desejado com a utilização da *Taq* DNA polimerase com capacidade para amplificar fragmentos maiores que 1500 bp.

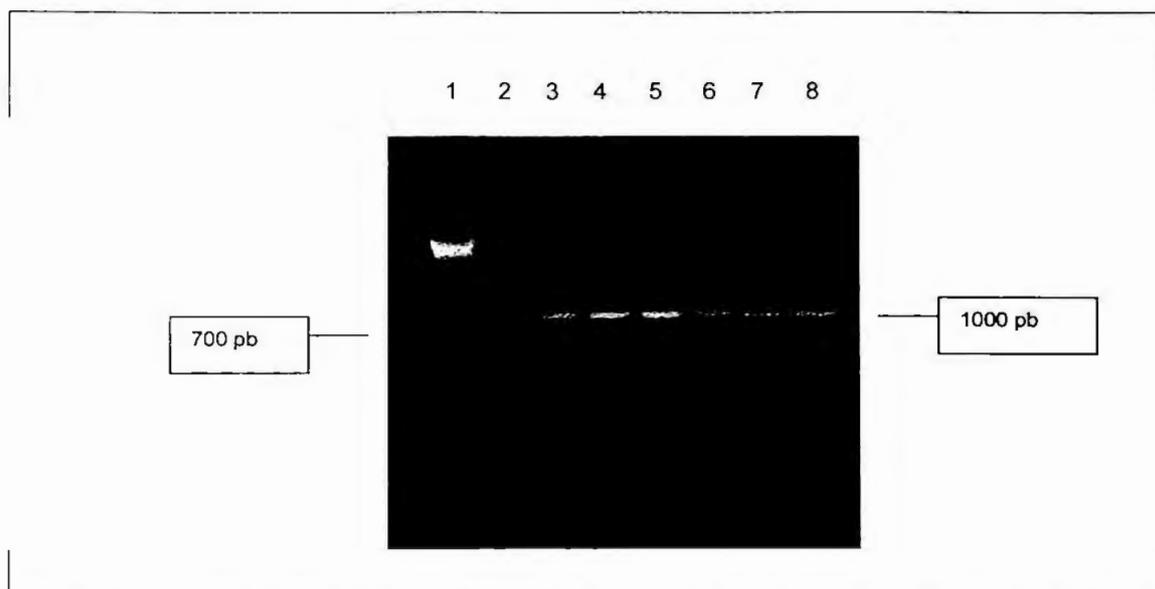
As amostras 2, 5, 21 e 12 foram previamente testadas por *Southern blot* (resultados não mostrados) (Lauer et al., 1980). Os genótipos

determinados pela técnica da PCR estão de acordo com os genótipos obtidos através do *Southern blot*.



**Figura 11:** Gel de agarose 1 %. A linha 1 é o marcador de 1 Kb. As linhas 2 e 4 representam os *primers* P1 e P2. A presença do fragmentos na linha 4 mostra o gene  $\alpha_2$  normal. As linhas 3 e 5 referem-se ao produto da PCR obtido com os *primers* P1 e P3. A presença do fragmentos demonstra a deleção  $\alpha^{3,7}$ .

Os resultados da avaliação da concentração de cloreto de magnésio mostrou melhor amplificação em 3,0 mM. (Fig. 12, pág. 45) com os *primers* P5/P6, utilizados para confirmação da deleção  $-\alpha^{3,7}$ . No entanto, essa amplificação foi possível apenas com adição de 7,0% de DMSO e temperatura de hibridação de 57°C, onde os resultados foram reproduzíveis. Utilizando as mesmas concentrações de cloreto de magnésio nas temperaturas de hibridação de 55 e 56°C, não houve amplificação do fragmento desejado. Para as amostras submetidas a mistura que continha os *primers* P5 e P6, foi possível visualizar a banda esperada de 1000 pb (Fig. 12, pág. 45), o que a presença da região 5' do gene  $\theta_1$ .



**Figura 12:** Gel de agarose 1 %. A linha 1 é o marcador de 100 pb. As linhas de 2 a 8 representam os *primers* P5 e P6. A presença dos fragmentos mostra que o indivíduo possui a região 5' do gene  $\theta_1$ .

#### 4.2 Análises das amostras dos indivíduos com microcitose e hipocromia não esclarecidas

A tabela 6 na página seguinte mostra os resultados do estudo para detecção da deleção  $-\alpha^{3,7}$  nos 23 indivíduos com microcitose e hipocromia a esclarecer. Verificou-se a existência da deleção  $-\alpha^{3,7}$  em 47,83 % (11/23) dos casos, sendo 90,91 % (10/11) heterozigotos e 9,09 % (1/11) homozigoto. Apresentaram resultados normais para a deleção  $-\alpha^{3,7}$ , 52,17 % (12/23).

Os indivíduos identificados como 8, 12, 14 e 22 que apresentaram resultados negativos para a pesquisa de hemoglobina H, confirmaram a presença da deleção  $-\alpha^{3,7}$  de forma heterozigota, pela técnica da PCR ( Tab.6).

Os indivíduos identificados como 1, 3, 5, 17, 19 e 21 que apresentaram resultados positivos para a pesquisa de hemoglobina H,

confirmaram a presença de  $\alpha$ -talassemia apresentando a deleção  $-\alpha^{3,7}$  de forma heterozigota.

O indivíduo identificado como 15 apresentou resultado positivo para a pesquisa de hemoglobina H e a presença da deleção  $-\alpha^{3,7}$  de forma homozigota.

**Tabela 6:** Genótipos dos indivíduos estudados

Pacientes	P1/P2	P1/P3	P5/P6	Genótipo	Hb H (cél.)
1	+	+	+	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	20
2	+	-	+	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	N
3	+	+	+	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	0,9*
4	+	-	+	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	N
5	+	+	+	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	1
6	+	-	+	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	N
7	+	-	+	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	N
8	+	+	+	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	N
9	+	-	+	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	N
10	+	-	+	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	N
11	+	-	+	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	N
12	+	+	+	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	N
13	+	-	+	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	N
14	+	+	+	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	N
15	-	+	+	$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$	7
16	+	-	+	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	N
17	+	+	+	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	3
18	+	-	+	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	N
19	+	+	+	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	1
20	+	-	+	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	N
21	+	+	+	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	2
22	+	+	+	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	N
23	+	-	+	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	N

**Legenda:** Primers: P1/P2 gene  $\alpha_2$  normal; P1/P3 deleção  $-\alpha^{3,7}$ ; P5/P6 região 5' do gene  $\theta_1$ / "+": ocorreu amplificação dos fragmentos/ "-": não ocorreu amplificação dos fragmentos/ N: não foi encontrado Hb H em lâmina/ \* fração H (eletroforese).

**Discussão**

---

## 5. Discussão

A  $\alpha$ -talassemia é um defeito hereditário onde a síntese das cadeias das  $\alpha$ -globinas está diminuída ou ausente. Tem sido observado que a entidade clinicamente reconhecida como talassemia tem origem em uma série de alterações moleculares (Steinberg e Adans III, 1982). Esta é uma das desordens genéticas de maior prevalência na população humana. Sua distribuição geográfica é altamente variável e em populações com alta incidência de malária a  $\alpha$ -talassemia pode atingir em torno de 80% da população (Villegas et al., 1998).

Indivíduos normais apresentam quatro genes  $\alpha$ , dois em cada cromossomo ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ). Os homozigotos para  $\alpha^+$ -talassemia ( $- \alpha/ - \alpha$ ) e heterozigotos para  $\alpha^0$ -talassemia ( $- -/\alpha\alpha$ ) apresentam um quadro clínico moderado com uma leve anemia microcítica. Os indivíduos heterozigotos para  $\alpha^+$ -talassemia ( $- \alpha/\alpha\alpha$ ) geralmente apresentam mudanças hematológicas insignificantes, com valores de hemoglobina, volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média tendendo ao limite inferior dos valores de referência (Villegas et al., 1998).

As formas suaves de  $\alpha$ -talassemias (portador assintomático ou traço  $\alpha$ -talassêmico) por alterações envolvendo um ou dois dos quatro genes funcionais, apresentam pequenas influências nas características fenotípicas dos eritrócitos. Uma vez que tais alterações não trazem consequências clínicas que se manifestem de modo a prejudicar o indivíduo, não é dada importância para estas características fenotípicas e para um diagnóstico adequado. Assim, o indivíduo permanece sem conhecer sua condição de portador.

---

Sem dúvida o diagnóstico das  $\alpha$ -talassemias pelas técnicas convencionais em um portador assintomático ou num indivíduo que apresenta o traço  $\alpha$ -talassêmico é bastante difícil, devido aos parâmetros hematológicos tais como hemoglobina, volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média apresentarem características muito próximas as da normalidade. Quando estes dados são sugestivos para  $\alpha$ -talassemia, são efetuadas as análises quantitativas das Hb A<sub>1</sub>, Hb A<sub>2</sub> e Hb F e as determinações bioquímicas relacionadas com o metabolismo do ferro. Se os resultados destas análises se apresentarem dentro dos valores de referências, outros tipos de triagem como pesquisa intra-eritrocitária de Hb H e/ou a eletroforese de hemoglobina para determinação da fração de Hb H são utilizados. Nem sempre é possível visualizar a Hb H intra-eritrocitária, mesmo que esta hemoglobina tenha sido detectada através da eletroforese e vice-versa. Entretanto o aparecimento da Hb H por qualquer um destes testes é indicativo de  $\alpha$ -talassemia cabendo o diagnóstico definitivo ao médico. (Naoum e Domingos, 1998).

A caracterização de defeitos moleculares das formas deletoriais das  $\alpha$ -talassemias foi durante muito tempo realizado através da análise do DNA genômico com enzimas de restrição seguida das técnicas de *Southern blot* e hibridização com sondas marcadas com substâncias radioativas. O advento da técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase) marcou uma evolução no diagnóstico laboratorial através da biologia molecular e simplificou a detecção das  $\alpha$ -talassemias mais comuns. Quando comparada com a técnica da análise do DNA genômico com enzimas de restrição, a técnica da PCR é simples, confiável, rápida e de baixo custo (Kattamis et al., 1996), podendo assim ser facilmente implantada na rotina de um laboratório.

A amplificação de alelos mutantes ou normais através de *primers* que flanqueiam a região de interesse tem sido aplicada tanto para a detecção das formas deletoriais quanto para a detecção das formas não-deletoriais

das  $\alpha$ -talassemias (Baysal e Huisman, 1994; Chang et al., 1993; Dodé et al., 1992; Galanello et al., 1998; Makonkawkeyoon et al., 1993). Para a detecção das formas deletacionais, os *primers* que representam as seqüências que flanqueiam as duas extremidades da região deletada são utilizados para amplificar seletivamente os locais adjacentes aos pontos de quebra da deleção. A amplificação desta região no DNA que não apresenta a deleção, usualmente não ocorre com a utilização das enzimas Taq polimerase de uso costumeiro em laboratórios, uma vez que os dois *primers* estão separados por uma distância muito grande. No DNA que apresenta a deleção, esta distância é menor, ocorrendo assim a amplificação do fragmento esperado. Um segundo par de *primers*, que amplifica uma região contida no fragmento deletado é utilizado. Neste caso, somente o alelo normal é amplificado. Assim, é distinguido o heterozigoto do homozigoto (Kattamis et al., 1996).

Para a detecção da deleção  $-\alpha^{3,7}$  foi utilizada a estratégia descrita por Kattamis et al. com sucesso. Para os *primers* utilizados houve a necessidade de alguns ajustes com relação a concentração de cloreto de magnésio e ao desnaturante químico (DMSO), que não foram as mesmas utilizadas por Smetanina e Huisman, 1996. A enzima Taq DNA polimerase utilizada para a amplificação dos fragmentos de 1760 pb, que caracterizam o gene  $\alpha_2$  normal e a deleção  $-\alpha^{3,7}$ , foi uma enzima com capacidade para amplificar fragmento maiores que 1500 pb, sem a qual não houve amplificação alguma. Quatro amostras previamente analisadas pela técnica de Southern blot (resultados não mostrados) foram utilizadas como controle da otimização do protocolo efetuado neste trabalho e os resultados encontrados com as duas técnicas foram compatíveis.

A deleção  $-\alpha^{3,7}$  é a forma mais comum da  $\alpha^+$ -talassemia citada na literatura até a presente data, porém é prevalente nas regiões do Mediterrâneo e em Africanos (Embury et al., 1980). A  $\alpha$ -talassemia foi

introduzida no Brasil principalmente por imigrantes do norte da Itália, que colonizaram várias regiões do Brasil no final do século 19 e início do século 20, assim como portugueses e espanhóis (Zago et al., 1983). Algumas deleções como a do tipo -MED ou  $-\alpha^{20,5}$  também são comumente encontradas nas regiões do Mediterrâneo. Anteriormente, foi encontrada a deleção -<sup>MED</sup> em uma mulher negra no Brasil, cujo pai era de origem italiana (Sonati et al., 1992) portanto, não se pode desconsiderar a existência de outras deleções além da deleção  $-\alpha^{3,7}$ , apesar de serem raras e características de certas regiões do mundo. Foi utilizado para confirmação dos resultados obtidos, a amplificação da região 5' do gene  $\theta_1$ , uma vez que a deleção  $-\alpha^{3,7}$  não elimina esta região. As deleções que acometem a região lateral 5' do gene  $\theta_1$  compreendem aproximadamente 30 Kb e deletam os genes  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$  totalmente.

No presente trabalho foram estudados 23 pacientes com dados hematológicos e bioquímicos sugestivos para  $\alpha$ -talassemia, sendo eles microcitose, hipocromia e perfil bioquímico relacionado com metabolismo de ferro normal. Estes pacientes foram selecionados num período que compreendeu aproximadamente 3 anos, pelos médicos do Ambulatório de Anemias do Serviço de Hematologia e Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Este serviço atende em média 50 pacientes por semana, aproximadamente 2400 pacientes/ano. De aproximadamente 7.200 pacientes que passaram pelo ambulatório de 1996 a 1998, apenas 0,32% (23/7200) foram selecionados para este estudo. Esta quantidade pode estar subestimada, uma vez que pacientes com outras patologias foram excluídos do estudo e existem dados que o percentual de  $\alpha$ -talassemia 2 (deleção  $-\alpha^{3,7}$ ) entre indivíduos com anemia falciforme é de 17,5 % (Figueiredo et al., 1996). Os indivíduos estudados eram brancos e mulatos, entretanto este parâmetro não foi pré-requisito. Levando-se em consideração o total de pacientes do ambulatório pode-se considerar que a  $\alpha$ -talassemia é observada em baixa freqüência no

Brasil. Mesmo assim é importante que o indivíduo assintomático conheça sua condição de portador, uma vez que possa vir a se casar com outro portador assintomático, dando chance do nascimento de um filho com Doença da Hb H, embora esta doença seja rara no Brasil.

Apesar de os 23 pacientes estudados apresentarem dados hematológicos similares e compatíveis com a  $\alpha$ -talassemia, foi observado a presença da deleção  $-\alpha^{3,7}$  em 47,83 % dos indivíduos estudados. Dados precisos sobre a prevalência e variabilidade da  $\alpha$ -talassemia no Brasil não são disponíveis. Alguns estudos efetuados no Brasil relatam maior prevalência de  $\alpha$ -talassemia entre populações de negros, onde a frequência do haplótipo  $-\alpha^{3,7}$  é de 0,13 (Sonati et al., 1992). O resultado encontrado no presente trabalho é maior do que aquele encontrado em um estudo efetuado numa população de Ribeirão Preto (interior de São Paulo – Brasil) com microcitose e hipocromia a esclarecer, que mostra um percentual em torno de 15 % para a  $\alpha$ -talassemia (Naoum e Domingos, 1998). Entretanto, a origem racial da população de cada região é diferente e as desordens genéticas podem apresentar uma distribuição desigual dentro do país (Sonati e Costa, 1990; Zago et al., 1983).

Sete dos 23 (30,43 %) pacientes apresentaram pesquisa intra-eritrocitária de HbH positiva e a deleção  $-\alpha^{3,7}$ . Verificou-se que a quantidade de células contendo Hb H em seu interior não influencia no grau da lesão. O indivíduo 1 apresentou 20 células (eritrócitos) contendo corpos de Hb H em seu interior e resultado heterozigoto para a deleção  $-\alpha^{3,7}$  ( $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ ), enquanto o indivíduo 15 apresentou 7 eritrócitos contendo corpos de Hb H em seu interior e resultado homozigoto para a deleção  $-\alpha^{3,7}$  ( $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$ ). Assim, não se pode levar em consideração o número de células encontradas para se avaliar o grau de lesão do agrupamento de genes das  $\alpha$ -globinas nos casos de indivíduos portadores ou ainda aqueles que apresentam o traço  $\alpha$ -talassêmico.

Quatro indivíduos que apresentaram resultados negativos para pesquisa intra-eritrocitária de HbH apresentaram a deleção  $-\alpha^{3,7}$  de forma heterozigota ( $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ ) pela técnica da PCR, confirmando a dificuldade de diagnóstico através das técnicas convencionais utilizadas para a triagem da  $\alpha$ -talassemia. Assim, em 11 indivíduos que apresentaram a deleção  $-\alpha^{3,7}$ , foi detectado a presença intra-eritrocitária de HbH em 63,64 % (7/11). Os 36,36 % (4/11) restantes, cujos resultados da pesquisa intra-eritrocitária de Hb H foram negativos, poderiam ter sido considerados como normais para a presença de  $\alpha$ -talassemia. Este fato caracteriza o resultado falso-negativo e confirma a ineficiência das técnicas convencionais de triagem.

Dos 23 indivíduos estudados, 52,17 % (12/23) apresentaram genótipos normais ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ) para a  $\alpha$ -talassemia com relação a deleção  $-\alpha^{3,7}$ , mesmo apresentando índices hematimétricos característicos de  $\alpha$ -talassemia. Nenhum destes indivíduos apresentaram pesquisa intra-eritrocitária de Hb H positiva. Não foi avaliado no presente estudo a presença de formas não-delecionais de  $\alpha$ -talassemia. Deste modo, não se pode excluir a possibilidade da existência de mutações que acometem o gene  $\alpha_2$ , as quais levam a ausência ou redução na expressão destes genes, que estão estruturalmente intactos, embora estas mutações sejam raras e suas distribuições geográficas limitadas (Nienhuis et al., 1984; Weatherall et al., 1989).

Mesmo sendo pequena a quantidade (0,32%) de indivíduos selecionados que apresentam microcitose e hipocromia, sem a deficiência de ferro, sabe-se que o quadro de  $\alpha$ -talassemia ocorre na população. Assim, ela não pode ser ignorada uma vez que a tendência dos defeitos genéticos que não causam sintomas ou agravos a saúde das pessoas é permanecer na população ou, a longo prazo, causar um impacto negativo inesperado no processo evolutivo das populações. Sob este ponto de vista, salienta-se a importância de se detectar os defeitos genéticos silenciosos, através de técnicas rápidas e seguras, disponibilizando os resultados aos portadores e

oferecendo a estes indivíduos esclarecimentos sobre sua condição ou até um aconselhamento genético adequado. Sabe-se que o casamento entre portadores do traço  $\alpha$ -talassêmico gera formas mais graves de  $\alpha$ -talassemias, as quais poderiam aparecer a longo prazo na população brasileira se não existir a possibilidade, através de técnicas seguras, de se fornecer diagnósticos conclusivos para casos de microcitose e hipocromia.

Portadores de  $\alpha$ -talassemias geralmente não são afetados clinicamente e são aparentemente saudáveis. Entretanto, em casais onde ambos são portadores de uma mutação, existe um risco de concepção de 25 % de uma criança estar afetada (Yong et al., 1999).

Com o advento das técnicas de biologia molecular, pode-se admitir a chegada da "era da triagem molecular". A triagem populacional através de "bioships" para portadores heterozigotos de doenças autossômicas recessivas comuns (que são normalmente restritas a certos grupos étnicos e raciais), possibilita estudar no presente momento mais de 4.000 mutações, onde estão incluídas provalvemente, as principais alterações metabólicas graves, e sem dúvida num futuro próximo estarão incluídas as talassemias e a anemia falciforme, que tem o objetivo de identificar portadores para aconselhamento genético mais adequado (Motulsky, 1997).

---

**Conclusão**

---

## 6. CONCLUSÃO

A PCR padronizada possibilitou o diagnóstico rápido da deleção  $-\alpha^{3.7}$  em indivíduos com características fenotípicas sugestivas para  $\alpha$ -talassemia.

A frequência de indivíduos com microcitose e hipocromia a esclarecer encontrada na população de brasileiros portadores de anemia foi de 0,32% .

A frequência de deleção  $-\alpha^{3.7}$  em pacientes com características fenotípicas sugestivas para  $\alpha$ -talassemia foi de 47,3%.

A metodologia padronizada é de utilidade para auxiliar no diagnóstico laboratorial colaborando na elucidação da microcitose e hipocromia não esclarecidas e pode ser facilmente implantada na rotina de um laboratório de para triagem.

---

## **Referências bibliográficas**

---

## Referências bibliográficas

- ABUELO, D.N., FORMAN, E.N., RUBIN, L.P., Limb defects and congenital anomalies of the genitalia in an infant with homozygous  $\alpha$ -thalassemia. **Am. J. Med. Genet.** New York, v.68, p.158-162, 1997
- AYALA, S., COLOMER, D., AYMERICH, M., ABELLA, E., CORRONS, J.L.V., First description of a frameshift mutation in the  $\alpha_1$ -globin gene associated with  $\alpha$ -thalassemia. **Br. J. Haematol.** Oxford, v.98, p.47-50, 1997.
- AYALA, S., COLOMER, D., AYMERICH, M., PUJADES, A., VIVES-CORRONS, J.L-I., Nondeletional  $\alpha$ -thalassemia: first description of  $\alpha^{\text{Hph}}\alpha$  and  $\alpha^{\text{Nco}}\alpha$  mutations in a Spanish population. **Am. J. Hematol.** New York, v.52, p.144-149, 1996.
- BABIOR B. M.; STOSSEL, T. P., In: BABIOR B. M.; STOSSEL, T. P., **Hematology. A Pathophysiological Approach.** 3.ed. N. York: Churchill Livingstone, 1994, p.27-42.
- BAIN, B.J., AMOS, R.J., BAREFORD, D., CHAPMAN, C., DAVIES, S.C., OLD, J.M., WILD, B.J., Guideline. The laboratory diagnosis of haemoglobinopathies. **Br. J. Haematol.** Oxford, v.101, p.783-792, 1998.
- BAYSAL, E., HUISMAN, T.H.J., Detection of common deletional  $\alpha$ -thalassemia-2 determinants by PCR. **Am. J. Hematol.** New York, v.46, p.208-213, 1994.
- BEAUDRY, M.A., FERGUSON, D.J., PEARSE, K., YANOFSKY, R.A., RUBIN, E.M., KAN, Y.W., Survival of a hydropic infant with homozygous  $\alpha$ -thalassemia-1. **J. Pediatr.** St. Louis, v.108, p.713-716, 1986.
- BENESCH, R.E., RANNEY, H.M., BENESCH, R., SMITH, M., The chemistry of the Borh effect. II. Some properties of hemoglobin H. **J. Biol. Chem.** Baltimore, v.236, n.11, p.2926-2929, 1961.
- BIANCHI, D.W., BEYER, E.C., STARK, A.R., SAFFAN, D., SACHS, B.P., WOLFE, L., Normal long-term survival with  $\alpha$ -thalassemia. **J. Pediatr.** St. Louis, v.108, p.716-718, 1986.

- BORIELLO, F., WEINBERG, D.S., MUTTER, G.L., Evaluation of gene deletion by quantitative polymerase chain reaction. Experience with the  $\alpha$ -thalassemia model. **Diagn. Mol. Pathol.** Oxford, v.3, n.4, p.246-254, 1994.
- BOWDEN, D.K., VICKERS, M.A., HIGGS, D.R., A PCR-based strategy to detect the common severe determinants of  $\alpha$  thalassemia. **Br. J. Hematol.** Oxford, v.81, p.104-108, 1992.
- BOWIE, L.J., REDDY, P.L., BECK, K.R., Alpha thalassemia and its impact on other clinical conditions. **DNA Technol. Clin. Lab.** v.17, n.1, p.97-108, 1997.
- BOWIE, L.J., REDDY, P.L., NAGABHUSHAM, M., SEVIGNY, P., Detection of  $\alpha$ -thalassemias by multiplex polymerase chain reaction. **Clin. Chem.** Washington, v.41, n.12, p.2260-2266, 1994.
- BRADLEY, T.B., WOHL, R.C., SMITH, G.J., Elongation of the  $\alpha$ -globin chain in a black family: interaction with HbG-Philadelphia. **Clin. Res.** New York, v.23, p.131A, 1975.
- BREUNING, M.H., MADAN, K., VERJAAL, M., WIJNEN, J.T., MEERA KHAN, P., PEARSON, P.L., Human  $\alpha$ -globin maps to pter-p13.3 in chromosome 16 distal to PGP. **Hum. Genet.** Berlin, v.76, n.3, p.287-289, 1987.
- BUCKLE, V.J., HIGGS, D.R., WILKIE, A.O.M., SUPER, M., WEATHERALL, D.J., Localisation of human  $\alpha$ -globin to 16p13.3-pter. **J. Med. Genet.** London, v.25, n.12, p.847-849, 1988.
- CHAN, A.Y.Y., SO, C.K.C., CHAN, L.C., Comparison of HbH inclusion test and a PCR test in routine screening for  $\alpha$  thalassaemia in Hong Kong. **J. Clin. Pathol.** London, v.49, p.411-413, 1996.
- CHANG, J-G., LEE, L-S., LIN, C-P., CHEN, P-H., CHEN, C-P., Rapid diagnosis of  $\alpha$ -thalassemia-1 of Southeast Asia type and hydrops fetalis by polymerase chain reaction. **Blood** New York, v.78, p.853-854, 1991.
- CHANG, J-G., TSENG, W-P., YANG, L-H., LEE, L-S., CHEN, P-H., LIU, T-C., Rapid diagnosis of hemoglobin Constant Spring and hemoglobin E by amplified created restriction sites. **Blood** New York, v.81, p.565-566, 1993.
- CHEN, T-P., LIN, S-F., CHANG, J-G., TSAO, C-J., LIU, T-C., CHIOU, S-S., LIU, H-W., Molecular characterization of Hb H disease by polymerase chain reaction. **Acta Haematol.** Basel, v.90, p.177-181, 1993.
- CHERNOFF, A.I., The distribution of the thalassemia gene: A historical review. **Blood** New York, v.14, n.9, p.899-912, 1959.

CHITAYAT, D., SILVER, M.M., O'BRIEN, K., WYATT, P., WAYE, J.S., CHIU, D.H.K., BABUL, R., THOMAS, M., Limb defects in homozygous  $\alpha$ -thalassemia: report of three cases. **Am. J. Med. Genet.** New York, v.68, p.162-167, 1997.

CLEGG, J.B., WEATHERALL, D.J., CONTOPOLOU-GRIVA, I., CAROUTSOS, K., POUNGOURAS, P., TSEVRENIS, H., Hemoglobin Icaria, a new chain termination mutant which causes  $\alpha$ -thalassemia. **Nature** London, v.251, p.245-247, 1975.

CLEGG, J.B., WEATHERALL, D.J., MILNER, P.F., Haemoglobin Constant Spring: a chain termination mutant? **Nature** London, v.234, p.337-340, 1971.

DACIE, J.V., LEWIS, S.M., Investigation of the haemoglobinopathies. In: DACIE, J.V., LEWIS, S.M., **Practical Haematology**. 6.ed. Churchill Livingstone, 1984, p. 179-199.

DAME, C., ALBRES, N., HASAN, C., BODE, U., EIGEL, A., HANSMANN, M., BRENNER, R., BARTMAN, P., Homozygous  $\alpha$ -thalassaemia and hypospadias – common aetiology or incidental association? Long-term survival of Hb Bart's hydrops syndrome leads to new aspects for counselling of  $\alpha$ -thalassaemic traits. **Eur. J. Pediatr.** Copenhagen, v.158, p.217-220, 1999.

DARNELL, J.E., Variety in level of gene control in eukaryotic cells. **Nature** London, v.297, n.5865, p.365-371, 1982.

DAVIS, L., KUEHL, M., BATTEY, J., **Basic methods in molecular biology**. 2.ed. Connecticut: Appleton & Lange, 1994, p.113-140.

DEJONG, W.W., KHAN, P.M., BERNINI, L.F., Hemoglobin Koya Dora: high frequency of a chain termination mutant. **Am. J. Hum. Genet.** Chicago, v.27, p.81-90, 1975.

DODÉ, C., KRISHNAMOORTHY, R., LAMB, J., ROCHETTE, J., Rapid analysis of  $-\alpha^{3.7}$  thalassaemia and  $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$  triplication by enzymatic amplification analysis. **Br. J. Haematol.** Oxford, v.82, p.105-111, 1992.

DOZY, A.M., KAN, Y.W., EMBURY, S.H., MENTZER, W.C., WANG, W.C., LUBIN, B., DAVIS, J.R.Jr., KOENIG, H.M.,  $\alpha$ -Globin gene organization in blacks precludes the severe form of  $\alpha$ -thalassaemia. **Nature** London, v.280, p.605-607, 1979.

EMBURY, S.H., LEBO, R.V., DOZY, A.M., KAN, Y.W., Organization of the  $\alpha$ -globin genes in the chinese  $\alpha$ -thalassemia syndromes. **J. Clin. Invest.** New York, v.63, p.1307-1310, 1979.

EMBURY, S.H., MILLER, J.A., DOZY, A.M., KAN, Y.W., CHAN, V., TODD, D., Two different molecular organizations account for the single  $\alpha$ -globin gene of the  $\alpha$ -thalassemia-2 genotype. *J. Clin. Invest.* New York, v.66, p.1319-1325, 1980.

FARAH, S.B., **DNA: Segredos e Mistérios.** São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos, 1997, p.255-272.

FEI, Y-J., LIU, J.C., WALKER III, E.L.D., HUISMAN, T.H.J., A new gene deletion involving the  $\alpha 2$ -,  $\alpha 1$ -, and  $\theta 1$ -globin genes in a black family with Hb H disease. *Am. J. Hematol.* New York, v.39, p.299-303, 1992.

FEI, Y-J., ÖNER, R., BÖZKURT, G., GU, L-H., ALTAY, C., GURGEY, A., FATTOUM, S., BAYSAL, E., HUISMAN, T.H.J., Hb H disease caused by a homozygosity for the AATAAA $\rightarrow$ AATAAG mutation in the polyadenylation site of the  $\alpha 2$ -globin gene: hematological observations. *Acta Haematol.* Basel, v.88, p.82-85, 1992.

FELBER, B.K., ORKIN, S.H., HAMER, D.H., Abnormal RNA splicing causes one form of thalassemia. *Cell* Cambridge, v.29, p.895, 1982.

FICHERA, M., SPALLETTA, A., FIORENZA, F., LOMBARDO, T., SCHILIRÒ, G., TAMOUZA, R., LAPOUMÉROULIE, C., LABIE, D., RAGUSA, A., Molecular basis of  $\alpha$ -thalassemia in Sicily. *Hum. Genet.* Berlin, v.99, p.381-386, 1997.

FIGUEIREDO, M.S., KERBAUY, J., GONÇALVES, M.S., ARRUDA, V.R., SAAD, S.T.O., SONATI, M.F., STOMING, T., COSTA, F.F., Effect of  $\alpha$ -thalassemia and  $\beta$ -globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. *Am. J. Hematol.* New York, v.53, p.72-76, 1996.

FISCHEL-GHODSIAN, N., VICKERS, M.A., SEIP, M., HIGGS, D.R., Characterization of two deletion that remove the intere human 3- $\alpha$  globin gene complex (- -<sup>thai</sup> and - -<sup>Fill</sup>). *Br. J. Haematol.* Oxford, v.70, p.233-241, 1988.

FLINT, J., HILL, A.V.S., BOWDEN, D.K., OPPENHEIMER, S.J., SILL, P.R., SERJEANTSON, S.W., KOIRI-BANA, J., BHATIA, K., ALPERS, M.P., BOYCE, A.J., WEATHERAL, D.J., CLEGG, J.B., High frequencies of  $\alpha$ -thalassemia are the result of natural selection by malaria. *Nature* London, v.321, p.744-750, 1986.

FOGLIETTA, E., DEIDDA, G., GRAZIANI, B., MODIANO, G., BIANCO, I., Detection of  $\alpha$ -globin gene disorders by a simple PCR methodology. *Haematologica* Roma, v.81, p.387-396, 1996.

FORGET, B.G., Molecular genetics of human hemoglobin synthesis. **Annal. Inter. Med.** Philadelphia, v.81, n.4, p.605-16, 1979.

FORTINA, P., DIANZANI, I., SERRA, A., GOHARDI, E., SAGLIO, G., FARINASSO, L., PIGA, A., GABUTTI, V., CAMASCHELLA, C., A newly-characterized  $\alpha$ -thalassemia-1 deletion removes the entire  $\alpha$ -like globin gene cluster in italian family. **Br. J. Haematol.** Oxford, v.78, p.529-, 1991.

GABUZDA, T.G., Hemoglobin H and the red cell. **Blood** New York, v.27, n.4, p.568-579, 1966.

GALANELLO, R., PIRASTU, M., MELIS, M.A., PAGLIETTI, E., MOI, P., CAO, A., Phenotype-genotype correlation in haemoglobin H disease in childhood. **J. Med. Genet.** London, v.20, p.425-429, 1983.

GALANELLO, R., SOLLAINO, C., PAGLIETTI, E., BARELLA, S., PERRA, C., DONEDDU, I., PIRRONI, M. G., MACCIONI, L., CAO, A.,  $\alpha$ -thalassemia carrier identification by DNA analysis in the screening for thalassemia. **Am. J. Hematol.** New York, v.59, p.273-278, 1998.

GEORGE, E., FERGUSON, V., YAKAS, J., KRONENBERG, H., TRENT, R. J., A molecular marker associated with mild hemoglobin H disease. **Pathol Oxon**, v.21, p.27-30, 1989.

GEORGE, E., MOKHTAR, A.B., AZMAN, Z.A., HASNIDA, K., SARIPAH, S., HWANG, C.M., Prenatal diagnosis of Hb Bart's hydrops fetalis in West Malaysia: the identification of the alpha thal 1 defect by PCR based strategies. **Sigapore Med. J.** Singapura, v.37, n.5, p.501-504, 1996.

HALL, G.W., THEIN, S.L., NEWLAND, A.C., CHISHOLM, M., TRAEGER-SYNODINOS, J., KANAVAKIS, E., KATTAMIS, C., HIGGS, D.R., A base substitution (T  $\rightarrow$  C) in codon 29 of the  $\alpha$ 2-globin gene causes  $\alpha$  thalassaemia. **Br J Haematol** Oxford, v.85, p.546-552, 1993.

HARDISSON, R.C., SAWADA, I., CHENG, J.F., SHEN, C.K J., ZCHIMID, C.W., A previously undetected pseudogene in the human alpha globin gene cluster. **Nucleic Acids Res.** London, v.14, p.1093-1911,1986.

HESS, J.F., FOX, M., SCHMID, C., SHEN, C.K.J., Molecular evolution of the human adult  $\alpha$ -globin-like gene region: insertion and deletion of *Alu* family repeats and non-*Alu* DNA sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** Washington, v.80, p.5970-5974, 1983.

HESS, J.F., SCHMID, C.W., SHEN, C.K.J., A gradiente of sequence divergence in the human adult  $\alpha$ -globin duplicatin units. **Science** Washington, v.226, p.67-70, 1984.

HIGGS, D.J., AYYUB, A., SU-CHONG, S., The -<sup>THAI</sup> and -<sup>FIL</sup> determinants of  $\alpha$  thalassaemia in Taiwan. **Am. J. Hematol.** New York, v.60, n.1, p.80-81, 1999.

HIGGS, D.J., AYYUB, A., CLEGG, J.B., HILL, A.V.S., NICHOLLS, R.D., TEAL, H., WAINSCOAT, J.S.,  $\alpha$  thalassaemia in the British people. **Br. Med. J.** London, v.290, p.1303-1306, 1985.

HIGGS, D.R., GOODBOURN, S.E.Y., LAMB, J., CLEGG, J.B., WEATHERALL, D.J., PROUDFOOT, N.J.,  $\alpha$ -thalassaemia caused by a polyadenylation signal mutation. **Nature** London, v.306, p.398-400, 1983.

HIGGS, D.R., HILL, A.V.S., BOWDEN, D.K., WEATHERALL, D.J., CLEGG, J.B., Independent recombination events between the duplicated human  $\alpha$  globin genes; implications for their concerted evolution. **Nucleic Acids Res.** London, v.12, n.18, p.6965-6977, 1984.

HIGGS, D.R., PRESSLEY, L., ALDRIDGE, B., CLEGG, J.B., WEATHERALL, D.J., CAO, A., HADJIMINAS, M.G., KATTAMIS, C., METAXATOU-MAVROMATI, A., RACHMILEWITZ, E.A., SOPHOCLEUS, T., Genetic and molecular diversity in nondeletion HbH disease. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** Washington, v.78, p.5833-5837, 1981.

HIGGS, D.R., SHARPE, J.A., WOOD, W.G., Understanding  $\alpha$  globin gene expression: a step towards effective gene therapy. **Semin. Hematol.** Orlando, v.35, n.2, p.93-104, 1998.

HIGGS, D.R., VICKERS, M.A., WILKIE, A.O.M., PRETORIUS, I.M., JARMAN, A.P., WEATHERALL, D.J., A review of the molecular genetics of the human  $\alpha$  - globin gene cluster. **Blood** New York, v.73, n.5, p.1081-1104, 1989.

HIGGS, D.R., WEATHERALL, D.J., Alpha-thalassaemia. **Curr. Top. Hematol.** New York, v.4, p.37, 1983.

HONIG, G.R., SHAMSUDDIN, M., VIDA, L.M., MOMPOINT, M., VALCOURT, E., BOWIE, L.J., JONES, E.C., POWERS, P.A., SPRITZ, R.A., GUIB, M., EMBURY, S.H., CONBOY, J., KAN, Y.W., MENTZER, W.C., WEIL, S.C., HIRATA, R.K., WALOCK, J., O'RIORDAN, J.F., GOLDSTICK, T.K., Hemoglobin Evaston ( $\alpha$ 14 Trp $\rightarrow$ Arg): an unstable  $\alpha$ -chain variant expressed as  $\alpha$ -thalassaemia. **J. Clin. Invest.** New York, v.73, p.1740-1749, 1984.

HONIG, G.R., SHAMSUDDIN, M., ZAIZOV, R., ATEINHERZ, M., SOLAR, I., KIRSCHMAN, C., Hemoglobin Petah Tikva ( $\alpha$ 110 Ala $\rightarrow$ Asp): a new unstable variant with  $\alpha$ -thalassaemia-like expression. **Blood** New York, v.57, n.4, p.705-711, 1981.

JONES, R.T., SCHROEDER, W.A., BALOG, J.E., Gross structure of hemoglobin H. **J. Amer. Chem. Soc.** Washington, v.81, p.3161-, 1959.

KATTAMIS, A.C., CAMASCHELLA, C., SIVERA, P., SURREY, S., FORTINA, P., Human  $\alpha$ -thalassemia syndromes: detection of molecular defects. **Am. J. Hematol.** New York, v.53, n.2, p.81-91, 1996.

KO, T-M., LI, S-F., Molecular characterization of the  $\alpha$ -<sup>FIL</sup> determinant of alpha-thalassemia. **Am. J. Hematol.** New York, v.60, n.2, p.173, 1999.

KO, T-M., TSENG, L-H., KAO, C-H., LIN, Y-W., HWA, H-L., HSU, P-M., LI, S-F., CHUANG, S-M., Molecular characterization and PCR diagnosis of Thailand deletion of  $\alpha$ -globin gene cluster. **Am. J. Hematol.** New York, v.57, n.2, p.124-130, 1998.

LAM, T-K., CHAN, V., FOK, T-F., LI, C-K., FENG, C-S., Long-term survival of a baby with homozygous alpha-thalassemia-1. **Acta Haematol.** Basel, v.88, p.198-200, 1992.

LAUER, J., SHEN, C.K.J., MANIATIS, T., The chromosomal arrangement of human  $\alpha$ -like globin genes: sequence homology and  $\alpha$ -globin gene deletions. **Cell** Cambridge, v.20, p.119-130, 1980.

LEHNINGER, A.L., **Pricípios de Bioquímica.** São Paulo: Sarvies Editora de Livros Médicos, 1988.

LIEBHABER, S.A., COLEMAN, M.B., ADANS III, J.G., CASH, F.E., STEINBERG, M.H., Molecular basis for nondeletion  $\alpha$ -thalassemia in american blacks. **J. Clin. Invest.** New York, v.80, p.154-159, 1987.

LIEBHABER, S.A., GOOSSENS, M., KAN, Y.W., Homology and concerted evolution at the  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  loci of human  $\alpha$ -globin. **Nature** London, v.290, p.26-29, 1981.

LIEBHABER, S.A., KAN, Y.W., Differentiation of the mRNA transcripts originating from the  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -globin loci in normals and  $\alpha$ -thalassemics. **J. Clin. Invest.** New York, v.68, p.439-446, 1981.

LIEBHABER, S.A.; KAN, Y.W.,  $\alpha$ -Thalassemia caused by an unstable  $\alpha$ -globin mutant. **J. Clin. Invest.** New York, v.71, n.3, p.461-466, 1983.

LIE-INJO, L.E.; HERRERA, A.R.; KAN, Y.W., Two types of triplicated  $\alpha$ -globin loci in humans. **Nucleic Acid Res.** London, v.9, p.3709-, 1981.

LUKENS, J.N., The thalassemias and related disorders: quantitative disorders of hemoglobin synthesis. In: LEE, G.R. BITHELL, T.C.

FOERSTER, J. ATHENS, J.W. LUKENS, J.N., **Wintrobe's Clinical Hematology**. 19.ed. Philadelphia: LEA & FEBIGER, 1993, v.1, p. 1102-1145.

LUZZI, G.A., MERRY, A.H., NEWBOLD, C.I., MARSH, K., PASVOL, G., WEATHERALL, D.J., Surface antigen expression on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is modified in alpha- and beta-thalassemia. **F. Exp. Med.** v.173, p.785-791, 1991.

MACH-PASCUAL, S., DARBELLAY, R., PILOTTO, P-A., BERRIS, P., Investigation of microcytosis: a comprehensive approach. **Eur. J. Haematol.** Copenhagen, v.57, p.54-61, 1996.

MAKONKAWKEYOON, L., SANGUANSEMSRI, T., ASATO, T., NAKASHIMA, Y., TAKEI, H., Rapid detection of chain termination mutations in the  $\alpha 2$  globin gene. **Blood** New York, v.82, n.11, p.3503-3504, 1993.

MARKS, J., SHAW, J-P., SHEM, C.K.J., Sequence organization and genomic complexity of primate  $\theta_1$  globin gene, a novel  $\alpha$ -globin like gene. **Nature** London, v.321, p.785-788, 1986.

MASPES, V., LUTHOLD, W.M., NAGAI, M.A., MARLET, J.M., Dosagem de ferro sérico e da capacidade de transporte de ferro pela transferrina. **Ver. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. São Paulo** São Paulo, v.37, n.1, p.5-9, 1982.

MERRITT, D., JONES, R.T., HEAD, C., THIBODEAU, S.N., FAIRBANKS, V.F., STEINBERG, M.H., COLEMAN, M.B., RODGERS, G.P., Hb Seal Rock [( $\alpha 2$ )142 Term $\rightarrow$ Glu, codon 142 TAA $\rightarrow$ GAA]: an extended  $\alpha$  chain variant associated with anemia, microcytosis, and  $\alpha$ -thalassemia-2 (-3,7 Kb)<sup>a</sup>. **Hemoglobin** Monticello, v.21, n.4, p.331-344, 1997.

MICHELSON, A.M., ORKIN, S.H., Boundaries of gene conversion within the duplicated human  $\alpha$ -globin genes. **J. Biol. Chem.** Baltimore, v.258, n.24, p.15245-15254, 1983.

MOCKENHAUPT, F.P., BIENZLE, U., MAY, J., FALUSI, A.G., ADEMOWO, O.G., OLUMESE, P.E., MEYER, C.G., *Plasmodium falciparum* infection: influence on hemoglobin levels in  $\alpha$ -thalassemia and microcytosis. **J. Infect. Dis.** Chicago, v.180, p.925-928, 1999.

MOI, P., CASH, F.E., LIEBHABER, S.A., CAO, A., PIRASTU, M., An initiation codon mutation (AUG $\rightarrow$ GUG) of the human  $\alpha 1$ -globin gene. Struttal characterization and evidence for a mild thalassemic phenotype. **J. Clin. Invest.** New York, v.80, p.1416-1421, 1987.

MORLE, F., LOPEZ, B., HENNI, T., GODET, J.,  $\alpha$ -Thalassemia associated with the deletion of two nucleotides at position -2 and -3 preceding the AUG codon. **EMBO J.** Oxford, v.4, p.1245- ,1985.

MOTULSKY, A.G., Screening for genetic diseases. **N. Engl. J. Med.** London, v.336, n.18, p.1314-1316, 1997.

MOUNT, S.M., A catalogue of splice junction sequences. **Nucleic Acid Res.** London, v.10, p.459, 1982.

MURAYAMA, M., The chemical structure of hemoglobin. In: SUNDERMAN, F.W.; SUNDERMAN JR., F.W., **Hemoglobin. Its Precursors and Metabolites**. 1.ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1979, p.1-9.

NAOUM, P.C., DOMINGOS, C.R.B., Em: NAOUM, P.C., **Hemoglobinopatias e Talassemias**. São Paulo: Sarvies Editora de Livros Médicos, 1997, p.25-30.

NAOUM, P.C., DOMINGOS, C.R.B., Talassemias alfa. **Laes & Haes** São Paulo, v.113, p.70-98, 1998.

NICHOLLS, R.D., FICHEL-GHODSIAN, N., HIGGS, D.R., Recombination at the human  $\alpha$ -globin gene cluster: sequence features and topological constraints. **Cell** Cambridge, v.49, p.369-378, 1987.

NICHOLLS, R.D., HIGGS, D.R., CLEGG, J.B., WEATHERALL, D.J.,  $\alpha^0$ -thalassemia due to recombination between the  $\alpha 1$ -globin gene and an *Alu* repeat. **Blood** New York, v.65, n.6, p.1434-1438, 1985.

NIENHUIS, A.W., ANAGNOU, N.P., LEY, T.J., Advances in thalassemia research. **Blood** New York, v.63, n.4, p.738-758, 1984.

OLIVEIRA, P.H., **Hematologia Clínica**. São Paulo: Livraria Atheneu Editora, 1990, p67.

OLIVIERI, N.F., Fetal erythropoiesis and the diagnosis and treatment of hemoglobin disorders in the fetus and child. **Semin. Perinat.** New York, v.21, n.1, p.63-69, 1997.

ORKIN, S.H., GOFF, S.C., HECTMAN, R.L., Mutation in an intervening sequence splice junction in man. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** Washington, v.78, n.8, p.5041-5045, 1981.

ORON-KARNI, V., FILONI, D., OPPENHEIN, A., RUND, D., Rapid detection of common Mediterranean  $\alpha$ -globin deletions/rearrangements using PCR. **Am. J. Hematol.** New York, v.58, p.306-310, 1998.

PAGLIETTI, E., GALANELLO, R., MOI, P., PIRASTU, M., CAO, A., Molecular pathology of haemoglobin H disease in Sardinians. **Br. J. Haematol.** Oxford, v.63, n.3, p.485-496, 1986.

---

PASVOL, G., Malaria and resistance genes – they work in wondrous ways. **Lancet** London, v.3481, p.532-1534, 1996.

PIRASTU, M., SAGLIO, G., CHANG, J. C., CAO, A., KAN, Y. W., Initiation codon mutation as a cause of  $\alpha$  thalassemia. **J. Biol. Chem.** Baltimore, v.259, n.20, p.12315-12317, 1984.

PRESSLEY, L., HIGGS, D.R., CLEGG, J.B., WEATHERALL, D.J., Gene deletion in  $\alpha$ -thalassemia prove that the 5' $\zeta$  locus is functional. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** Washington, v.77, p.3586-3589, 1980a.

PRESSLEY, L., HIGGS, D.R., ALDRIGE, B., METAXATOU-MAVROMATI, A., CLEGG, J.B., WEATHERALL, D.J., Characterization of a new  $\alpha$ -thalassemia 1 defect due to a partial deletion of the  $\alpha$ -globin gene complex. **Nucleic Acids Res.** London, v.8, p.4889-4898, 1980b.

PROUDFOOT, N.J., BROWNLEE, G.G., Nucleotide sequences of globin messenger RNA. **Br. Med. Bull.** Edinburgh, v.32, n.3, p.251-256, 1976a.

PROUDFOOT, N.J., BROWNLEE, G.G., 3' Non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. **Nature** London, v.263, p.211-214, 1976b.

PROUDFOOT, N. ; MANIATIS, T., The Structure of a human  $\alpha$ -globin pseudogene and its relationship to  $\alpha$ -globin gene duplication. **Cell** Cambridge, v.21, p.537-544, 1980.

RAPAPORT, S.I.; **Hematologia: Introdução.** São Paulo: Livraria Roca, 1990, p.61-82.

RAWN, J.D., Hemoglobin and myoglobin: oxigen-binding proteins. In: **Biochemistry.** Burlington: Neil Patterson Publishers, 1989, p.121-147.

REDDY, P.L., BOWIE, L.J., Sequence - based diagnosis of hemoglobinopathies in the clinical laboratory. **Clin. Lab. Med.** V.17, n.1, p.85-96, 1997.

REES, D.C., WILLIAMS, T.N., MAITLAND, K., CLEGG, J.B., WEATHERALL, D.J., Alpha thalassaemia is associated with increased soluble transferrin receptor levels. **Br. J. Haematol.** Oxford, v.103, p.365-369, 1998.

RIGAS, D.A., KOLER, R.D., OSGOOD, E.E., New hemoglobin possessing a higher electrophoretic mobility than normal adult hemoglobin. **Science** Washington, v.121, p.372, 1955.

SAFAYA, S., TRAUBER, D.R., RIEDER, R.F., Studies on the in vitro and in vivo expression of a dysfunctional  $\alpha$ -globin gene. **Am. J. Hematol.** New York, v.39, p.188-193, 1992.

SANGUANSEMSRI, T., MATRAGOON, S., CHANGLOAH, L., FLATZ, G., Hemoglobin Suan-Dok ( $\alpha_2^{109(G16)LEU-ARG}\beta_2$ ): an unstable variant associated with  $\alpha$ -thalassemia. **Hemoglobin Monticello**, v.3, p.161, 1979.

SCHILIRÒ, G., MIRABILE, E., TESTA, R., RUSSO-MANCUSO, G., DIBENEDETTO, S.P., Presence of hemoglobinopathies in Sicily: a historic perspective. **Am. J. Med. Gen.** New York, v.69, p.200-206, 1997.

SCHRIER, S.L., Pathophysiology of the thalassemias. **W. J. Med.** v.167, n.2, p.82-89, 1997.

SCOTT, G.L., RASBRIDGE, M.R., GRIMES, A.J., In vitro studies of red cell metabolism in haemoglobin H disease. **Br. J. Haematol.** Oxford, v.18, n.1, p.13-28, 1970.

SEID-AKHAVAN, M., WINTER, W. P., ABRAMSON, R. K., RUCKNAGEL, D. L., Hemoglobin Wayne: a frameshift mutation detected in human hemoglobin alpha chains. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** Washington, v.73, n.3, p.882-886, 1976.

SHAW, J-P., MARKS, J., SHEM, C-K.J., Evidence that the recently discovered  $\theta$ 1-globin gene is functional in higher primates. **Nature** London, v.326, p.717-720, 1987.

SINISCALCO, M., BERNINI, L., FILIPPI, G., LATTE, B., MEERA KHAN, P., PIOMELLI, S., RATTAZZI, M., Population genetics of haemoglobin variants, thalassaemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, with particular reference to the malaria hypothesis. **Bull. WHO.** Geneva, v.34, p.379-393, 1966.

SIVERA, P., ROETTO, A., Mazza, U., CAMASCHELLA, C., Feasibility of molecular diagnosis of  $\alpha$ -thalassemia in evaluation of microcytosis. **Haematologica** Roma, v.82, p.592-593, 1997.

SMETANINA, N.S., HUISMAN, T.H.J., Detection of  $\alpha$ -thalassemia-2 (-3,7 Kb) and its corresponding triplication  $\alpha\alpha\alpha$  (Anti-3,7 Kb) by PCR: an improved technical change. **Am. J. Hematol.** New York, v.53, n.3, p.202-3, 1996.

SMETANINA, N.S.; LEONOVA, J.Y.; LEVY, N.; HUISMAN, T.H.J., The  $\alpha / \beta$ - and  $\alpha_2 / \alpha_1$ -globin mRNA ratios in different forms of  $\alpha$ -thalassemia. **Biochem. Biophys. Acta** Amsterdam, v.1315, p.188-192, 1996.

---

SMETANINA, N.S., ÖNER, C., BAYSAL, E., ÖNER, R., BOZKURT, G., ALTAY, Ç., GÜRGEY, A., ADEKILE, A.D., GU, L-H., HUISMAN, T.H.J., The relative levels of  $\alpha 2$ -,  $\alpha 1$ - and  $\zeta$ -mRNA in Hb H patients with different deletional and nondeletional  $\alpha$ -thalassemia determinants. **Biochem. Biophys. Acta Amsterdam**, v.1316, p.176-182, 1996.

SONATI, M.F., COSTA, F.F., Hemoglobin Bart's in a brazilian black population. **Brazilian J. Med. Biol. Res. São Paulo**, v.23, n.5, p.395-396, 1990.

SONATI, M.F., KIMURA, E.M., GROTTTO, H.Z.W., TAVELLA, M H., COSTA, F.F., Hb H disease associated with the (-<sup>MED</sup>) deletion in a brazilian black woman. **Acta Haematol. Basel**, v.87, n.3, p.145-147, 1992.

STEINBERG, M.H., ADAMS III, J.G., Thalassemia: recent insights into molecular mechanisms. **Am. J. Hematol. New York**, v.12, n.1, p.81-92, 1982.

STEINBERG, M.H., COLEMAN, M.B., ADAMS III, J.G., HARTMAN, R.C., SABA, H., ANAGNOU, N.P., A new gene deletion in the  $\alpha$ -like globin gene cluster as the molecular basis for the rare  $\alpha$ -thalassemia-1 ( $-\alpha\alpha$ ) in blacks: Hb H disease in sickle cell trait. **Blood New York**, v.67, n.2, p.469-473, 1986.

TAYLOR, J.M., DOZY, A., KAN, Y.W., VARMUS, H.E., LIE-INJO, E., GANESON, J., Genetic lesions in homozygous  $\alpha$ -thalassemia (hydrops fetalis). **Nature London**, v.251, p.392-393, 1974.

TRAEGER-SYNODINOS, J., KANAVAKIS, E., TZETIS, M., KATTAMIS, A., KATTAMIS, C., Characterization of nondeletional  $\alpha$ -thalassemia mutations in greek population. **Am. J. Hematol. New York**, v.44, p.162-167, 1993.

VANDENPLAS, S., HIGGS, D.R., NICHOLLS, R.D., BESTER, A.J., MATHEW, C.G., Caracterization of a new  $\alpha^0$ -thalassaemia defect in the South African population. **Br. J. Haematol. Oxford**, v.66, p.539-542, 1987.

VELATI, C., SAMPIETRO, M., BIASSONI, M., CAPPELLINI, M.D., WAINSCOAT, J.S., HIGGS, D. R., FIORELLI, G., Alpha thalassaemia in an Italian population. **Br. J. Haematol. Oxford**, v.63, n.3, p.497-501, 1986.

VILLEGAS, A., PORRES, A., SANCHEZ, J., GONZÁLEZ, F.A., PÉREZ-CLAUSELL, C., MARTÍNEZ, M., MURGA, M.J., CACHÁ, J., LOZANO, M., FERNÁNDEZ-FUERTES, I., ARCO, A.D., ARRIZABALAGA, B., MENDIGUREN, B.P., JUAN, I.S., SAAVEDRA, R., RICART, P., SAINZ, C., GUERRA, J.L., MUÑOZ, J.A., LAGO, C., ANSÓ, V.M., Red blood cell phenotypes in  $\alpha$ -thalassemia in the Spanish population. **Haematologica Roma**, v.83, p.99-103, 1998.

- VILLEGAS, A., SANCHEZ, J., GONZÁLEZ, F.A., CARREÑO, D.L., ROPERO, P.,  $\alpha$ -Thalassemia-1 (- - <sup>CAL</sup> mutation) in a spanish family. **Am. J. Hematol.** New York, v.46, n.4, p.367-368, 1994.
- YONG, K.N., WADSWORTH, L.D., LANGLOIS, S., YONG, S.L., WILSON, R.D., Thalassemia carrier screening and prenatal diagnosis among the British Columbia (Canada) population of chinese descent. **Clin. Genet.** v.55, p.20-25, 1999.
- WAYE, J.S., ENG, B., PATTERSON, M., CHUI, D.H.K., **Blood** New York, v.83, p.341B, 1994.
- WEATHERALL, D.J., The thalassaemias. **BMJ** London, v.314, p.1675-1678, 1997.
- WEATHERALL, D.J., The thalasseмии. In: BEUTLER, E., LICHTMAN, M. A., COLLER, B.S., KIPPS, T.J., **Williams Hematology**. 15.ed. New York: MacGraw-Hill, 1995, p.581-615.
- WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B.; BOON, W.H., The haemoglobin constitution of infants with hydrops fetalis. **Br. J. Haematol.** Oxford, v.18, p.357-359, 1970.
- WEATHERALL, D.J., CLEGG, J.B., HIGGS, D.R., WOOD, W.G., The hemoglobinopathies. In: SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S., VALLE, D., **The metabolic basis of inherited disease**. 6.ed. New York: MacGraw-Hill, 1989, v.2, p.2281-2339.
- WEATHERALL, D.J., CLEGG, J.B., NAUGHTON, M.A., Globin synthesis in thalassaemia: na *in vitro* study. **Nature** London, v.208, p.1061-1065, 1965.
- WHO Working Group. Community control of hereditary anaemias: Memorandum from a WHO meeting. Hereditary anaemias: genetics basis, clinical features, diagnosis, and treatment. **Bull. WHO** Geneva, v.60, n.5, p.643-660, 1982.
- WILKIE, A.O.M., BUCKLE, V.J., HARRIS, P.C., LAMB, J., BARTON, N.J., REEDERS, S.T., LINDENBAUM, R.H., NICHOLLS, R.D., BARROW, M., BETHLENFALVAY, N.C., HUTZ, M.H., TOLMIE, J.L., WEATHERALL, D.J., HIGGS, D.R., Clinical features and molecular analysis of the  $\alpha$  thalassemia/ mental retardation syndromes. I. Cases due to deletions involving chromosome band 16p13.3. **Am. J. Hum. Genet.** Chicago, v.46, p.1112-1126, 1990.
- WILLIAMS, T.N., MAITLAND, K., BENNETT, S., GANCZAKOWSKI, M., PETO, T.E.A., NEWBOLD, C.I., BOWDEN, D.K., WHEATHERALL, D.J.,

CLEGG, J.B., High incidence of malaria in  $\alpha$ -thalassaemic children. **Nature** London, v.383, p.522-525, 1996a.

WILLIAMS, T.N., MAIRLAND, K., GANCZAKOWSKI, M., PETO, T.E.A., CLEGG, J.B., WEATHERALL, D.J., BOWDEN, D.K., Red blood cell phenotypes in the  $\alpha^+$  thalassaemias from early childhood to maturity. **Br. J. Haematol.** Oxford, v.95, p.266-272, 1996b.

WINICHAGOON, P., THONGLAIROAN, V., FUCHAROEN, S., TANPHAICHITR, V.S., WASI, P.,  $\alpha$ -thalassaemia in Thailand. **Hemoglobin** Monticello, v.12, p.485-489, 1988.

ZAGO, M.A.; COSTA, F.F., Hereditary haemoglobin disorders in Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** London, v.79, p.385-388, 1985.

ZAGO, M.A., COSTA, F.F., TONE, L.G., BOTTURA, C., Hereditary hemoglobin disorders in a brazilian population. **Hum. Hered.** Basel, v.33, n.2, p.125-129, 1983.