

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/12862

DOUTORADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1990



MARIA DE FÁTIMA SONATI

"TALASSEMIA ALFA COM DEFICIÊNCIA GÊNICA
EM UMA POPULAÇÃO NEGRÓIDE BRASILEIRA"

*Em exemplar corresponde
a redação final da Tese
defendida pela candidata
Maria de Fátima Sonati e
aprovada pela Comissão Julgadora
Antonio Sérgio Ramalho*

Tese de Doutorado apresentada ao
Curso de Pós - Graduação em
Genética do Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Orientador Prof. Dr. Antonio
Sérgio Ramalho

Departamento de Genética Médica -
Faculdade de Ciências Médicas -
UNICAMP.

CAMPINAS

1990

O presente trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FINEP) e do Fundo de Apoio à Pesquisa (FAP), da UNICAMP.

As análises hematológicas, envolvendo o estudo das hemoglobinas, foram realizadas no Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. A primeira parte da análise de DNA, que consistiu da extração, digestão, eletroforese e transferência, foi desenvolvida no Laboratório de DNA do Departamento de Genética Médica (FCM-UNICAMP), coordenado pela Profa.Dra. Solange Bento Farah, enquanto a segunda parte, hibridização e autoradiografia, no Laboratório de Hematologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da USP, em Ribeirão Preto, sob orientação do Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. Antonio Sérgio Ramalho, pela orientação deste doutoramento.

À Profa.Dra. Solange Bento Farah, pelo que me ensinou e pela amizade.

À Profa.Dra. Denise Y. J. Norato, pelo auxílio nas análises estatísticas e no emprego do computador.

Aos demais professores do Curso de Pós-Graduação.

Ao Prof.Dr. Carmino Antonio de Souza, que facultou-me o acesso aos doadores de sangue do Hemocentro da UNICAMP, cuja organização em muito facilitou a obtenção do material.

Ao Prof.Dr. Fernando Ferreira Costa, co-orientador informal deste trabalho, pela contribuição em várias etapas de sua realização, pelo seu profissionalismo e seriedade, pelo estímulo e, sobretudo, pelo exemplo.

Às biólogistas Elza M. Kimura, Clarisa F. Ramos e Maria H. Tavela e às técnicas Eumíria L. O. Souza e Maria Madalena V. Rosa, pela valiosa e excelente colaboração técnica.

À Dra. Maricilda P. de Mello, pelas sugestões que muito me auxiliaram no decorrer do trabalho.

A todos os colegas e funcionários dos departamentos envolvidos

Aos funcionários que compuseram a amostragem.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	26
CASUÍSTICA.....	28
MÉTODOS.....	30
I - ANÁLISES HEMATOLÓGICAS.....	31
1. Hematimetria.....	31
2. Análise das Hemoglobinas.....	31
II - ANÁLISE DE DNA.....	34
1. Extração de DNA de Sangue Total.....	34
2. Digestão.....	35
3. Separação Eletroforética dos Fragmentos.....	36
4. Transferência ("Southern Blot").....	37
5. Hibridização.....	38
III - ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	42
RESULTADOS.....	43
DISCUSSÃO.....	55

RESUMO E CONCLUSÕES.....	65
SUMMARY.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
APÊNDICE 1.....	85
APÊNDICE 2.....	91

INTRODUÇÃO

AS HEMOGLOBINAS HUMANAS

As hemoglobinas humanas são tetrâmeros formados pela combinação de 2 cadeias polipeptídicas do "tipo alfa" (alfa- α ou zeta- ζ) com 2 cadeias do "tipo beta" (beta- β , delta- δ , épsilon- ϵ , gama-A- γ ou gama-G- γ). Cada cadeia contém um grupo prostético heme, que se liga reversivelmente com a molécula de oxigênio, cumprindo assim a função primária da hemoglobina, que é o transporte de O_2 (10).

A síntese das cadeias globínicas está sob o controle de genes distintos, separados em 2 agrupamentos ("clusters"); os genes que codificam as cadeias alfa e zeta estão no cromossomo 16 ("cluster alfa"), enquanto aqueles que codificam as cadeias beta, delta, gama e épsilon estão no cromossomo 11 ("cluster beta"). Esses genes se expressam em diferentes estágios do desenvolvimento, e, para que o tetrâmero funcional possa ser formado, é preciso que a sua expressão se dê de forma balanceada, equilibrada. Assim, no estágio embrionário, são produzidas as hemoglobinas Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland I ($\zeta_2\gamma_2$); no período fetal, estas são substituídas pela hemoglobina Fetal ($\alpha_2\gamma_2$), que, por sua vez, dá lugar às hemoglobinas A, ou A_1 ($\alpha_2\beta_2$) e A_2 ($\alpha_2\delta_2$) no adulto. Em indivíduos normais, a hemoglobina A é predominante, compondo mais de 95% do total da hemoglobina celular, enquanto a A_2 se

mantém em níveis entre 2-3% e a Fetal entre 0-2% (10, 33).

OS GENES DA GLOBINA ALFA - ESTRUTURA, EVOLUÇÃO E EXPRESSÃO

Os genes que codificam as cadeias alfa da hemoglobina são duplicados (alfa 2 e alfa 1), separados por menos de 4 Kb de DNA, e estão organizados no complexo multigênico ("cluster") denominado agrupamento alfa (9,50,59,84,106). A estrutura desse agrupamento foi primeiramente delineada há cerca de 10 anos, e hoje já se encontra quase completamente conhecida. Ele está localizado no braço curto do cromossomo 16 (16p 13.3), contido em um segmento de DNA de cerca de 30 Kb, e inclui, além dos dois genes alfa, o gene da cadeia embrionária zeta (zeta 2), 3 genes não funcionais (pseudogenes zeta 1, alfa 2 e alfa 1) e um gene de função indeterminada (teta 1 - θ_1), arranjados na seguinte ordem . 5' - zeta 2 - pseudo zeta 1 - pseudo alfa 2 - pseudo alfa 1 - alfa 2 - alfa 1 - teta 1 - 3' (Figura 1) (50,66). Como os demais genes de globinas, os genes alfa são compactos (de 1 a 2 Kb), compostos de 3 exons interrompidos por dois introns (Figura 2) (22,50,66). Os dois genes são altamente similares, apresentando apenas 17% de divergência estrutural, limitada ao intron 2 (IVS 2) e exon 3, na região 3' não codificante. Dessa forma, alfa 2 e alfa 1 codificam

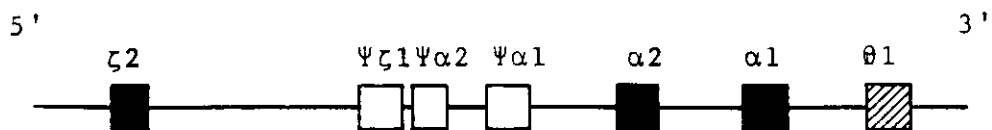


Figura 1 - AGRUPAMENTO ALFA (braço curto do cromossomo 16) (66)

- - gene funcional
- - pseudogene
- ▨ - gene de função indeterminada

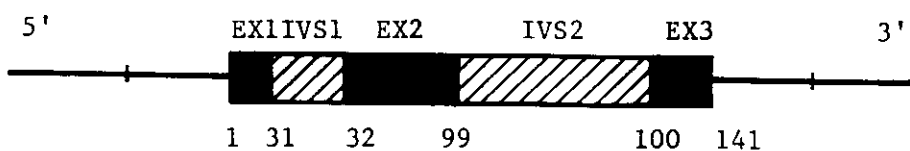


Figura 2 - GENES DA GLOBINA ALFA - ESTRUTURA (22)

A primeira linha vertical (à esquerda) indica a localização das regiões promotoras do gene, enquanto a última (à direita) indica o sítio de poliadenilação. Ex representa os exons e IVS os introns.

cadeias polipeptídicas idênticas (44,50,77). Estudos envolvendo mapeamento gênico, análises sequenciais e comparações interespecíficas indicam que toda a família multigênica da qual fazem parte os genes alfa evoluiu através de uma série de duplicações, seguidas de inserções e deleções de DNA que ocasionaram as divergências (52). Assim, o par alfa 2 / alfa 1 é resultante da duplicação de um gene alfa ancestral, ocorrida há pelo menos 270 milhões de anos. Este evento resultou em duas unidades de duplicação. Posteriormente, inserções ou deleções dividiram estas regiões em 3 subsegmentos homólogos (X, Y e Z). Os genes alfa 1 e alfa 2 estão contidos nas regiões homólogas Z, denominadas Z alfa 1 e Z alfa 2, respectivamente (Figura 3) (22,44,50). A comparação das seqüências inteiras destes dois segmentos (Z alfa 1 e Z alfa 2) mostra que eles são altamente conservados, sendo o maior grau de divergência correspondente à região 3' não codificante dos genes alfa (44,77). Considerando que a duplicação ocorreu há praticamente 300 milhões de anos e que estes genes divergiram daqueles de outras espécies relacionadas, o elevado grau de similaridade estrutural sugere que eles trocam informações sequenciais, evoluindo simultaneamente. A presença das regiões de alta homologia facilitaria o alinhamento incorreto dos cromossomos durante a meiose, provocando trocas de material genético entre Z alfa 1 de um cromossomo e Z alfa 2 do outro (44,66,77). Esta evolução paralela vem sendo comprovada por sequenciamento de proteínas e dos próprios genes, e os mecanismos propostos para explicar

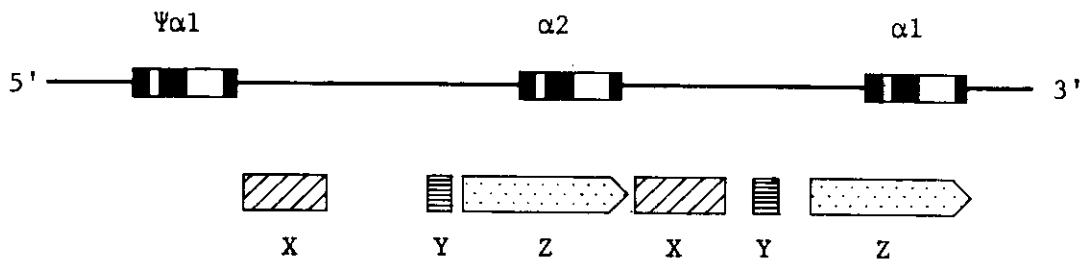


Figura 3 - OS SUBSEGMENTOS HOMÓLOGOS X, Y, Z,
CONTENDO OS GENES ALFA (22)

esse fenômeno são a conversão gênica e a recombinação homóloga ("crossing over") desigual (44,77,115).

Quanto ao nível de expressão, métodos que, explorando a divergência existente nas seqüências das regiões 3' não codificantes, foram capazes de estimar as quantidades de RNA mensageiro (mRNA) de alfa 1 e de alfa 2 em reticulócitos, demonstraram que o nível de RNA de alfa 2 predomina sobre o de alfa 1 em uma proporção de 2,6 : 1, provavelmente em razão de diferenças ao nível transcricional. A predominância de RNA mensageiro de alfa 2 sugere que esse gene tem um papel dominante na expressão da globina alfa. No entanto, a síntese normal de cadeias alfa depende do correto funcionamento destes dois genes, ou seja, dos quatro genes no genoma diplóide (50,66).

A TALASSEMIA ALFA

As síndromes talassêmicas alfa representam uma alteração genética frequente, de distribuição mundial, ocasionada pela deficiência de síntese das cadeias alfa da hemoglobina (10). A reduzida disponibilidade dessas cadeias, além de ocasionar menor formação de hemoglobina nas células, com conseqüente microcitose e hipocromia, leva ao acúmulo das outras cadeias cuja síntese está preservada. Estas, em excesso, se agregam em tetrâmeros. Assim, no feto, as cadeias gama que se

tetramerizaram dão origem a uma hemoglobina anômala, a Hb Bart's (γ_4), que apresenta elevada afinidade pelo oxigênio (64,116,118). Com a substituição da produção das cadeias gama pelas cadeias beta, no adulto, a concentração de Hb Bart's sofre progressiva redução, e as cadeias beta em excesso dão origem à Hb H (β_4). Essa hemoglobina, além da elevada afinidade pelo oxigênio, é altamente instável e tende a precipitar nas hemácias com o seu envelhecimento, formando corpos de inclusão (corpos de inclusão de Hb H). A precipitação da Hb H acarreta lesões na membrana celular e destruição prematura das células pelo sistema reticuloendotelial (10,118). Os corpos de inclusão podem ser visualizados à microscopia óptica após incubação das hemácias com azul brilhante de cresil.

BASES MOLECULARES / CLASSIFICAÇÃO

A investigação direta dos genes de pacientes talassêmicos revelou que mecanismos genéticos diferentes estão envolvidos na etiologia da talassemia alfa (10,50,55,66,67,83,108,119). Mapeamento, clonagem e sequenciamento de DNA de mutantes têm demonstrado que a produção deficiente de cadeias alfa é resultante de uma variedade de alterações, como mutações de ponto, inserções de nucleotídeos, deleções de seqüências controladoras, que assim, afetam muitos dos estágios da expressão gênica, como o nível de transcrição do DNA ou o

processamento do pré-mRNA. Existem ainda alterações que ocasionam a produção de cadeias alfa alongadas que, embora estáveis e capazes de tetramerização, estão associadas à menor estabilidade do mRNA, com marcada redução da síntese da variante (Hb Constant Spring, Hb Icaria, Hb Koya Dora, Hb Seal Rock). Outras afetam resíduos cujo papel na estabilidade da molécula é crítico, resultando em variantes altamente instáveis, que são rapidamente proteolizadas, a menos que sejam imediatamente incorporadas no tetrâmero (Hb Quong Sze, Hb Evanston). Mas são as deficiências as causas mais frequentes de talassemia alfa (10,24,58,84,102). Elas podem comprometer um ou ambos os genes no genoma haplóide, e de acordo com o grau em que afetam a expressão gênica, as talassemias são classificadas em alfa⁰ (α⁰) ou alfa⁺ (α⁺), a exemplo da nomenclatura adotada para talassemia beta (65,119). A supressão total da síntese de cadeias alfa corresponde à talassemia alfa⁰, oriunda de deficiências envolvendo ambos os genes do mesmo cromossomo (haplótipo $\alpha\alpha$) ou, alternativamente, totalmente um dos genes e parcialmente o outro que, no entanto, permanece inativo, denominado gene disfuncional (haplótipo $\alpha\alpha$). A caracterização dessas deleções mostrou que várias delas removem o complexo gênico inteiro, inclusive o gene zeta 2 e teta 1, de função desconhecida. Outras deixam intacto o gene zeta 2 que pode, em alguns casos, se expressar na vida adulta produzindo pequenas quantidades de cadeias zeta (63). Constitui exceção uma deleção incomum, (αα)^{RA}, que remove a região 3' do complexo

mantendo os genes alfa intactos, mas com expressão bloqueada. Ainda não está claro, neste caso, se a síntese de cadeias alfa está totalmente abolida. As deleções responsáveis pela talassemia alfa^o resultam de eventos de recombinação não homóloga, cujos mecanismos não estão claramente definidos, e estão sumarizadas na figura 4. As duas mais comuns são (α -^{SEA}) e (α -^{MED}), que ocorrem no Sudeste Asiático e na Bacia do Mediterrâneo, respectivamente (10,50,58,66,119).

A talassemia alfa⁺ é resultante da deficiência de um dos genes alfa no genoma haplóide (haplótipo $-\alpha$), com consequente redução da síntese de cadeias alfa. A deleção de um único gene provavelmente constitui a causa mais frequente de talassemia alfa, chegando, em algumas populações, a níveis tão elevados como 80% (30,66). O mapeamento gênico com enzimas de restrição demonstrou que esta deleção resulta de "crossing over" desigual, através de dois mecanismos diferentes, demonstrados na Figura 5 (22,50,58,66). A recombinação recíproca entre os segmentos Z, envolvendo um fragmento de 3,7Kb de DNA, produz cromossomos com somente um gene alfa ($-\alpha^{Z}$) e, reciprocamente, cromossomos com três genes alfa ($\alpha\alpha\alpha^{ANTI-Z}$). Por outro lado, recombinação entre os segmentos X, envolvendo um fragmento de 4,2Kb, dá origem ao cromossomo talassêmico ($-\alpha^{X}$) e ao recíproco anti-talassêmico ($\alpha\alpha\alpha^{ANTI-X}$). Por causa do relativo posicionamento destes "crossing overs", a mutação $-\alpha^{Z}$ é referida como deleção à direita ("rightward deletion"), e a mutação $-\alpha^{X}$ como deleção à esquerda ("leftward

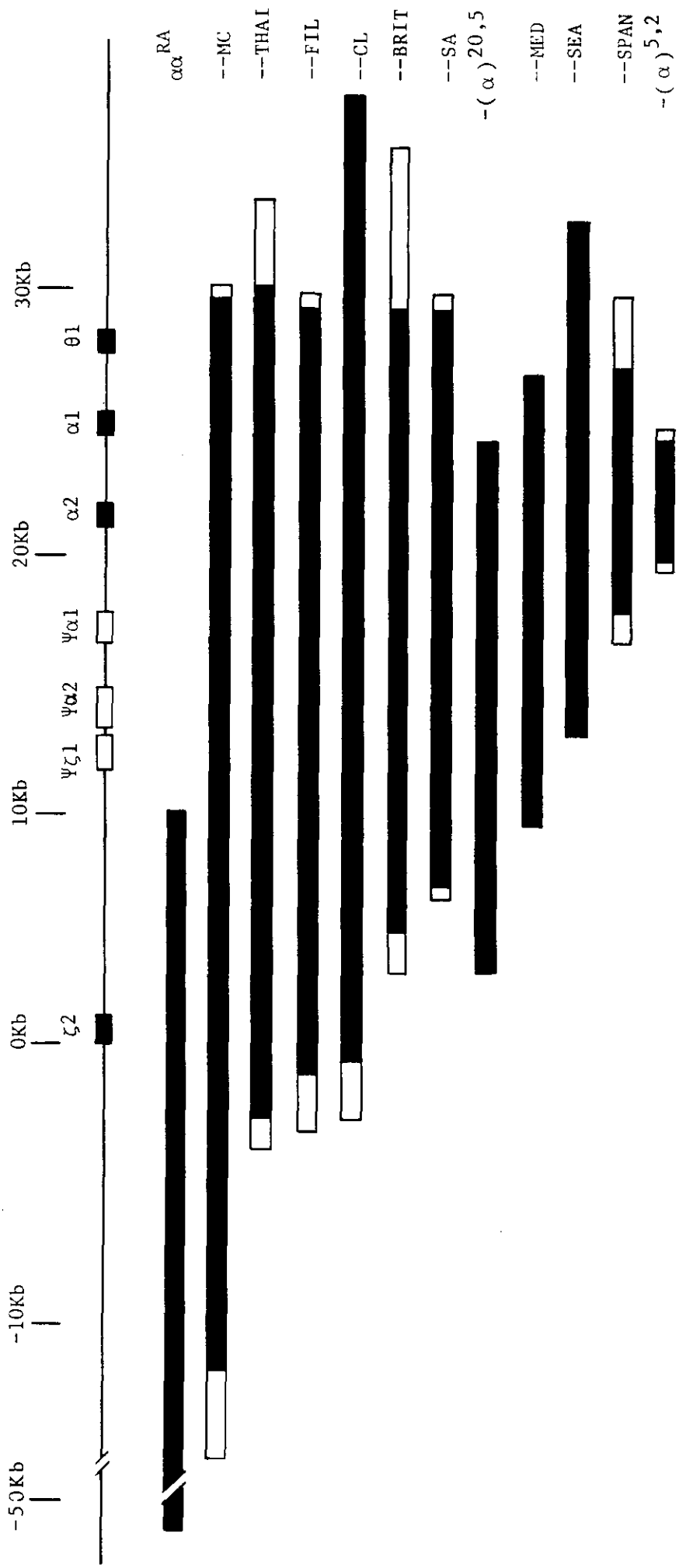


Figura 4 - RESUMO DAS MAIORES DELEÇÕES DESCRITAS NO AGUPAMENTO ALFA, QUE RESULTAM NA PERDA DE EXPRESSÃO DE AMBOS OS GENES ALFA (49)

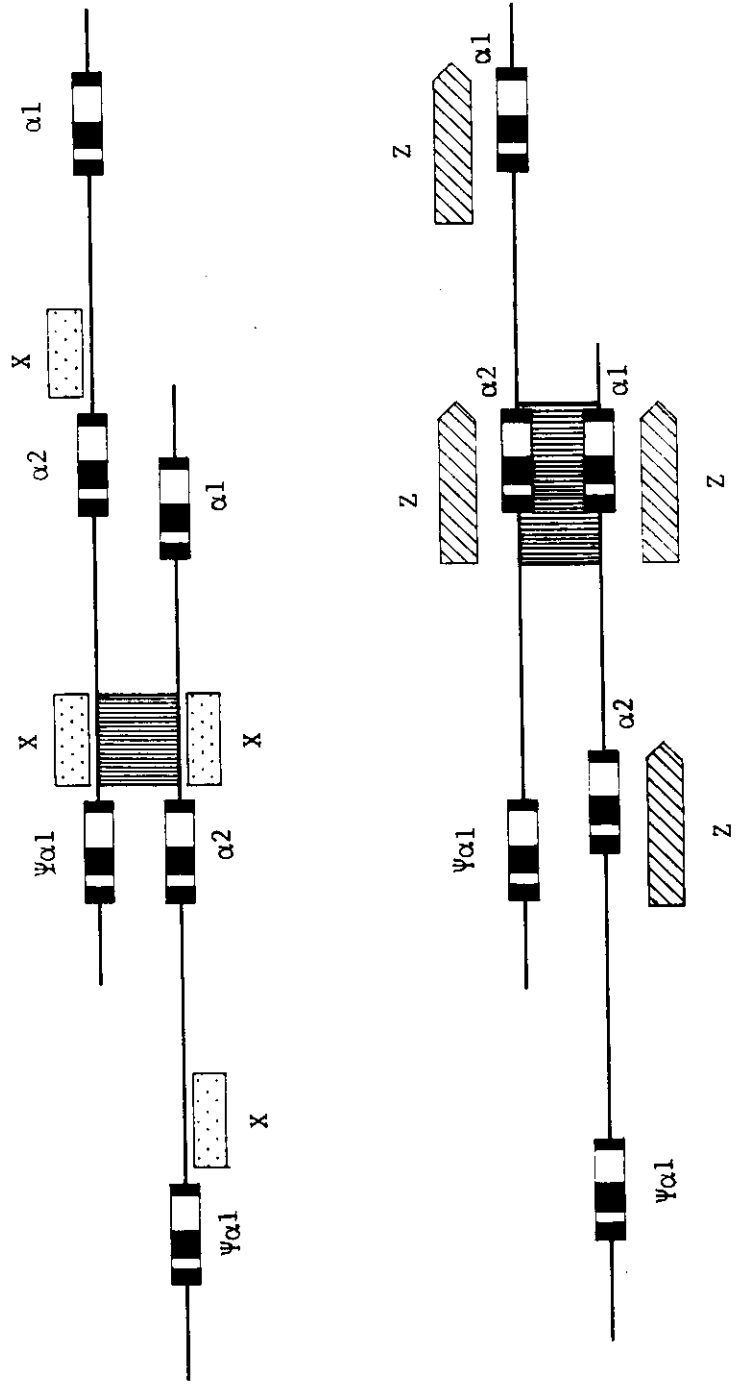


Figura 5 - "CROSSING OVER" ENTRE CROMOSSOMOS DESALINHADOS,

ORIGINANDO OS HAPLÓTIPOS $\alpha 1 \alpha 2$ E $\alpha 1 \alpha 1$

E $\alpha 1 \alpha 1$ E $\alpha 1 \alpha 2$ (22)

deletion") Embora possam coexistir em altas frequências em uma mesma população, a primeira ($-\alpha^{\Delta 3.7}$) é a causa mais comum de talassemia alfa, tendo distribuição mundial, enquanto a segunda ($-\alpha^{\Delta 4.2}$), frequente entre Asiáticos, é raramente encontrada em Negros e Mediterrâneos. A expressividade destas duas deleções também é diferente, uma vez que, no primeiro caso, o gene restante no cromossomo talassêmico ou é um híbrido alfa 2 - alfa 1 ou é o gene alfa 2 intacto, enquanto, no segundo caso, o gene resultante é sempre o alfa 1, que, como já referido, é menos transcrito (8,26,50). Em qualquer caso, no entanto, o nível de expressão parece ser maior do que nas mutações não deletoriais, por um efeito que parece ser compensatório diante da ausência de um dos genes alfa (10,44,50,58,66). Mais recentemente, através de mapeamento gênico e análise de mRNA, ficou demonstrado que a talassemia $-\alpha^{\Delta 3.7}$ é uma entidade heterogênea, que pode ser subdividida em pelo menos 3 tipos: I, II e III ($-\alpha^{\Delta 3.7}$ I, $-\alpha^{\Delta 3.7}$ II e $-\alpha^{\Delta 3.7}$ III), dependendo da região exata do segmento Z onde a recombinação ocorre (44). Do total de deficiências $-\alpha^{\Delta 3.7}$ examinadas, a do tipo I foi a mais frequentemente observada, sendo encontrada em todas as populações estudadas. A deficiência do tipo II foi observada na Jamaica, no Sudeste Asiático e no Mediterrâneo, e a do tipo III somente na Melanésia e Polinésia (51). Ainda, originando a talassemia alfa⁺, há uma outra deleção, com poucos casos descritos, caracterizada pela perda de 3,5 Kb de DNA ($-\alpha^{\Delta 3.5}$) (50)

A triplicação do gene alfa ($\alpha\alpha\alpha$) pode ser encontrada nas populações onde as deleções $-\alpha^{3.7}$ ou $-\alpha^{4.2}$ ocorrem em frequências elevadas. Com relação à expressão, é possível demonstrar que o gene extra é transcrito in vivo, mas é difícil detectar, de forma reprodutível, um aumento na proporção de síntese de globinas alfa / beta in vitro, a não ser em casos de homozigose ($\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$). Há algumas evidências de que a expressão do gene alfa extra pode exacerbar o fenótipo beta-talassêmico em heterozigotos, resultando em talassemia beta intermedia, mas dados conflitantes existem (37,60,66,96,107).

QUADROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Os múltiplos quadros clínicos e laboratoriais associados às talassemias alfa são resultantes da heterozigose, da homozigose ou da interação das duas formas principais de talassemia alfa, a alfa^o e a alfa⁺ (10,12,64,118,119). A heterozigose da talassemia alfa⁺ está relacionada com a presença de 1-3% de Hb Bart's ao nascimento sem, no entanto, apresentar qualquer alteração hematológica, ou das frações de hemoglobina, no adulto. A homozigose dessa forma de talassemia (genes alfa em "trans"), assim como a heterozigose da talassemia alfa^o (genes alfa em "cis"), são caracterizadas hematologicamente por microcitose e hipocromia discretas, com pequeno grau de anisocitose e poiquilocitose, diminuição da fragilidade

osmótica, nível de hemoglobina diminuído ou normal, contagem de hemácias geralmente superior a 5 milhões, e presença de 5-10% de Hb Bart's ao nascimento, sem alterações hemoglobínicas no adulto, pois a Hb H, quando em pouca quantidade, é rapidamente proteolizada na célula, não podendo ser detectada. A homozigose da talassemia alfa⁰ constitui a síndrome de Hidropisia Fetal por Hb Bart's; essa alteração clínica tem como consequência a morte intra-uterina, ou algumas horas após o nascimento, de seus portadores. É caracterizada por anemia acentuada, hepatoesplenomegalia, edema, ascite e hidropisia grave. O sangue periférico apresenta intensa anisocitose, hipocromia, reticulocitose, presença de numerosos eritroblastos, e contém essencialmente Hb Bart's, podendo aparecer pequenas quantidades de Hb H e Hb Portland I. A afinidade elevada da Hb Bart's pelo oxigênio impede a efetiva oxigenação dos tecidos, causando hipóxia grave, que é, em última análise, a causa da morte fetal (10,118)

A interação da talassemia alfa⁰ com a talassemia alfa⁺ corresponde a uma outra síndrome, a Doença da Hb H, caracterizada por anemia hemolítica crônica de intensidade moderada. Os portadores apresentam hepatoesplenomegalia, moderada reticulocitose, redução da fragilidade osmótica, presença de 25-50% de Hb Bart's ao nascimento e 5-30% de Hb H na vida adulta. A anemia pode tornar-se mais grave durante a gravidez, infecções, ou após a ingestão de drogas oxidantes, que aceleram a oxidação e precipitação da Hb H. O sangue

periférico mostra microcitose, hipocromia, poiquilocitose, policromatofilia, células em alvo, e as hemácias apresentam corpos de inclusão após incubação do sangue com azul brilhante de cresil (10,118). As diferentes formas de talassemia alfa, os genótipos correspondentes e os aspectos clínicos e laboratoriais estão resumidos no Quadro 1 (10,106,118,119).

DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da talassemia alfa apresenta dificuldades, pois somente dois estados expressam alterações clínicas significativas: a homozigose da talassemia alfa⁰ (Hidropisia Fetal por Hb Bart's) e a interação alfa⁰ / alfa⁺ (Doença da Hb H). Os demais estados não apresentam manifestações clínicas, e as alterações laboratoriais são pouco perceptíveis no adulto (10,48,119). Os índices hematimétricos, que poderiam funcionar como indicadores de redução da síntese de cadeias alfa, apresentam, nesses estados, considerável superposição com aqueles encontrados em indivíduos normais, sendo assim de pouco valor na distinção entre os diferentes genótipos (27,49,57). A detecção e quantificação da Hb Bart's no período neonatal, através da análise eletroforética de sangue de cordão umbilical, permite estimativas populacionais através da identificação daqueles indivíduos que apresentam níveis de Hb Bart's superiores a 2% (2,48,64,69,81,90,93,116,119,130). No

QUADRO I - DIFERENTES FORMAS DE TALASSEMIA ALFA (119)

DENOMINAÇÃO	GENÓTIPO	ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS
talassemia α^+ heterozigótica	$-\alpha/\alpha\alpha$	0 - 3% de Hb Bart's ao nascimento, alterações hematológicas mínimas ou ausentes.
talassemia α^+ homozigótica	$-\alpha/-\alpha$	5 - 10% de Hb Bart's ao nascimento; microcitose e hipocromia discretas.
talassemia α^{\ominus} heterozigótica	$--/\alpha\alpha$	similares aos da talassemia α^+ homozigótica.
talassemia α^{\ominus} homozigótica	$--/--$	aproximadamente 100% de Hb Bart's; Hidropisia Fetal por Hb Bart's.
interação $\alpha^{\ominus} / \alpha^+$	$--/-\alpha$	25-50% de Hb Bart's ao nascimento, 5 - 30% de Hb H na vida adulta. Doença da Hb H

entanto, o método é limitado, pois em muitos casos de heterozigose da talassemia alfa⁺, as quantidades de Hb Bart's são inferiores a esse valor, sendo indetectáveis, impossibilitando o diagnóstico individual (27,46). Além disso, o método não faculta o diagnóstico de indivíduos adultos. A medida da proporção de síntese de cadeias alfa / beta, determinada na síntese de globinas em reticulócitos, também pode, nestes mesmos casos, não fornecer uma clara distinção dos genótipos (29,50). A análise do DNA genômico com o emprego de endonucleases de restrição, através do método de Southern ("Southern-Blotting") (101) não só possibilitou a obtenção de grandes avanços no conhecimento da estrutura e organização dos genes alfa, porque elucidou questões concernentes às deleções que não podiam ser respondidas por hibridização molecular em solução, como permitiu diagnosticar os estados "assintomáticos" da talassemia alfa. Assim, os heterozigotos para a deficiência de um único gene podem ser facilmente detectados através desses procedimentos (10,19,47,48,116,119). Além disso, o diagnóstico pode ser feito em qualquer período da vida do indivíduo. O Quadro 2 demonstra a estratégia usada pelo método na determinação dos diferentes genótipos (61).

DISTRIBUIÇÃO

A talassemia alfa é uma das mais frequentes alterações

QUADRO 2 - TAMANHOS DOS FRAGMENTOS DE DNA (Kb) EM INDIVÍDUOS NORMAIS E EM DIFERENTES GENÓTIPOS α -TALASSÊMICOS, APÓS DIGESTÃO COM AS ENZIMAS Bam HI E Bgl II E HIBRIDIZAÇÃO COM AS SONDAS CORRESPONDENTES AOS GENES α E ζ (61)

GENÓTIPO α	Bam HI-SONDA α	Bgl II-SONDA ζ	Bgl II-SONDA α
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	14	11,3* + 12,6	12,6 + 7,4
$-\alpha/\alpha\alpha$	14 + 10,5	11,3* + 12,6 + 16	16 + 12,6 + 7,4 (deleção 3,7 Kb) 12,6 + 7,4 (deleção 4,2 Kb)
$--/\alpha\alpha$	14	11,3* + 12,6 + 13,9	12,6 + 7,4
$-\alpha/-\alpha$	10,5	11,3* + 16	16
$--/-\alpha$	10,5	11,3* + 13,9 + 16	16
$\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$	17,7 + 14		12,6 + 7,4 + 3,7 (anti - 3,7) 16 + 12,6 + 7,4 (anti - 4,2)

* - este fragmento pode variar de 10,5 a 12 Kb, mas o tamanho mais frequentemente observado é o de 11,3 Kb.

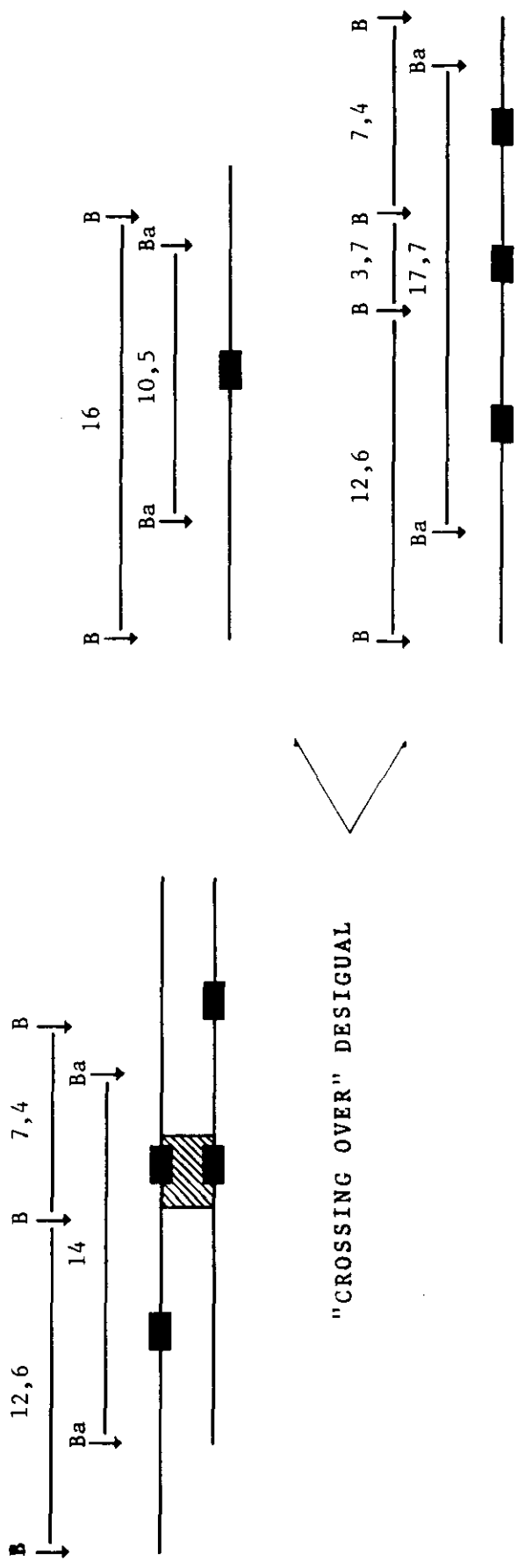
genéticas humanas, com distribuição limitada às regiões tropicais e subtropicais, ocorrendo esporadicamente fora dessa área (10,50). Nestas regiões, ocorre com incidência elevada entre os povos da Ásia e Oceania (China, Tailândia, Índia, Malásia, Melanésia, Polinésia, Nova Guiné) (35,51,53,68,69,78,110,120,122,129), do Oriente Médio (Turquia, Arábia Saudita) (85,89), e da Região do Mediterrâneo, principalmente Grécia e Itália (18,36,38,40,61,62,112,113). No continente africano, tem distribuição praticamente universal (31,32,41,42,73,79,80,90,93,111). Na América foi descrita em vários países, como Estados Unidos, Canadá, México, Cuba, Costa Rica, Jamaica, Colômbia, Peru e Brasil (3,12,13,20,49,57,72,87,94,95,100,121,124, 126,127). A deleção $-\alpha^{3.7}$, como já referido, é a mais comum condicionante de talassemia alfa na maioria das populações investigadas.

Nos negros, a despeito da elevada frequência de Hb Bart's encontrada em diversos estudos populacionais e da observação comum de indivíduos com fenótipos sugestivos de talassemia alfa, são raros os casos de Doença de Hb H (e, em geral, não tão graves quanto aqueles observados em outras populações), e não existem descrições de Hidropisia por Hb Bart's (34,48,117). Esse impasse somente foi esclarecido em definitivo com os estudos de mapeamento gênico. Assim, Dozy e colaboradores (19), em 1979, e Higgs e colaboradores (47), em 1980, demonstraram que a análise de DNA de indivíduos negros com fenótipo talassêmico apresentava, diferentemente dos asiáticos, um único

fragmento de DNA, menor que o normal, compatível com o genótipo de homozigose da talassemia alfa⁺ ($-\alpha / -\alpha$) (genes alfa em "trans"). Essa observação foi confirmada por vários outros estudos, sendo assim estabelecido que a forma prevalente de talassemia alfa nessas populações é a alfa⁺. Estudos com populações negras americanas, africanas e na Jamaica determinaram que a frequência do haplótipo talassêmico ($-\alpha$) varia entre 0,12 e 0,16, significando que cerca de 30% dos indivíduos dessas populações são heterozigotos, e 1-2% são homozigotos da talassemia alfa⁺. Os raros casos de Doença da Hb H resultam da união de um cromossomo com a forma prevalente de talassemia alfa⁺, com o cromossomo muito raro no qual ambos os genes estão ausentes (16,24,49,97). A figura 6 esquematiza o "crossing-over" desigual, com mapeamento do cromossomo normal, do talassêmico e do triplicado (10).

ASSOCIAÇÕES

A talassemia alfa pode estar associada a alterações estruturais da hemoglobina (10,28,29,49,86,103,104), ou mesmo às talassemias beta (5,62,75,114). A coexistência de talassemia alfa⁺, sobretudo no estado homozigótico, afeta os índices hematimétricos e a evolução clínica da anemia falciforme. Estudos preliminares demonstraram que, nesses casos, as hemácias tem volume corpuscular médio menor, há um aumento da



"CROSSING OVER" DESIGUAL

Figura 6 - DEFICIÊNCIA α_2 ("rightward deletion"),
 O RECÍPROCO LOCUS GÊNICO TRIPLICADO E OS
 SÍTIOS DE RESTRIÇÃO DAS ENZIMAS Bam HI (Ba)
 E Bgl II (B) (32)

taxa de hemoglobina total e uma redução da contagem de reticulócitos (1,12,17,25,43,49,74,99,105). Estudos mais recentes consideram que o mecanismo fundamental pelo qual a talassemia alfa beneficia os pacientes com anemia falciforme está relacionado ao aumento da relação superfície / volume (consequente à redução do volume corpuscular médio e da hemoglobina corpuscular média) e à proteção que isto confere contra lesões de membrana induzidas durante a falcização, perda de cátions e desidratação celular. Em células mais hidratadas e com a concentração da hemoglobina corpuscular média reduzida, há um retardo da polimerização da desoxihemoglobina S. Consequentemente, há redução na falcização intravascular, hemólise mais lenta, e menor grau de anemia, confirmados pela comprovada sobrevivência circulatória das hemácias falcizadas dos talassêmicos alfa, menor quantidade de células irreversivelmente falcizadas (CIF), menores taxas de bilirrubina e menor quantidade de células desidratadas (21,23,104). Quanto às manifestações clínicas, os resultados não são conclusivos, pois a redução da hemólise pode levar a um aumento de viscosidade sanguínea, aumentando também os riscos de manifestações vaso-oclusivas (4). A interação da talassemia alfa com heterozigotos da Hb S tem, como efeito mais notável, a redução da quantidade de Hb S, que é proporcional ao número de genes alfa, ou seja, indivíduos com 4 genes alfa tem maior proporção de Hb S (aproximadamente 35%) do que aqueles com 3 (30%), 2 (25%) ou 1 (17%) desses genes. A talassemia alfa

intensifica a competição entre cadeias beta normais e beta variantes. Se a variante for carregada positivamente, como é o caso das cadeias beta⁺ e beta^o, a afinidade de ligação com as cadeias alfa, positivas, diminui, resultando em menor proporção da Hb anômala (10,121).

A interação da talassemia beta com a talassemia alfa ocasiona redução do desequilíbrio entre a síntese de cadeias alfa e não alfa, com conseqüente diminuição de cadeias alfa livres, resultando em significativa alteração da gravidade da doença. Homozigotos beta^o não dependentes de transfusão com frequência possuem concomitantemente talassemia alfa, e o fenótipo dos heterozigotos é marcadamente modificado pela coexistência da talassemia alfa (5,62,66,75).

A TALASSEMIA ALFA NO BRASIL

No Brasil, são conhecidos poucos casos da Doença da Hb H (126,128), e os levantamentos populacionais existentes são baseados na detecção de Hb Bart's em sangue de cordão umbilical (12,86,100,124,127). O único trabalho realizado no país que utilizou a técnica de mapeamento gênico em um grande número de indivíduos foi o de Costa e colaboradores (13), em 1989, que analisou a presença de talassemia alfa em uma amostra de pacientes com anemia falciforme.

No primeiro estudo realizado com população selecionada, negróide, Sonati e Costa (100) detectaram, através da análise eletroforética de sangue de cordão umbilical de 320 RN, 38 RN (11,9%) com Hb Bart's. Destes, 33 (10,3%) apresentaram níveis entre 1,5 e 3,8% da hemoglobina anômala, sendo considerados heterozigotos da talassemia alfa⁺, enquanto que os outros 5 (1,6%) apresentaram entre 5,9 e 10,0% de Hb Bart's, sendo considerados homozigotos. A frequência do haplótipo talassêmico (- α), determinada a partir dos homozigotos através da equação de Hardy-Weinberg, foi de 0,125, compatível com outras populações negras estudadas. A frequência esperada de heterozigotos foi então calculada em 22%, praticamente o dobro da frequência observada. Assim, os autores concluíram, com base no número de homozigotos encontrados, e considerando a população analisada em equilíbrio, que cerca de metade dos heterozigotos nela presentes não foram detectados pela metodologia empregada. Por outro lado, ficou pela primeira vez comprovada, através desse estudo, a elevada frequência da talassemia alfa na população negróide brasileira (cerca de 23,5%).

OBJETIVOS

Os principais objetivos do presente trabalho foram identificar a ocorrência da talassemia alfa com deficiência gênica em uma população negróide brasileira, através da análise de DNA, e comparar a frequência obtida com a anteriormente detectada nessa população através da metodologia eletroforética (detecção e quantificação de Hb Bart's em sangue de cordão umbilical).

Concomitantemente, comparou-se o número de hemácias (HM), a concentração de hemoglobina (Hb), o hematócrito (Ht), o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM), e as percentagens de Hb A₂, de Hb Fetal (Hb F) e de reticulócitos, entre os heterozigotos da talassemia alfa* e os indivíduos normais

CASUÍSTICA

Neste trabalho foram coletadas, para análise, amostras de sangue periférico de 47 indivíduos negróides, escolhidos ao acaso entre doadores de sangue do Hemocentro do Hospital de Clínicas da Unicamp (Campinas-SP) e entre funcionários deste mesmo hospital que, voluntariamente, fizeram parte da amostragem. Dos indivíduos analisados, 48% eram negros e 52% mulatos.

As amostras de sangue (de cerca de 20 ml) foram coletadas em tubos plásticos contendo EDTA (sal di-sódico do ácido etileno-dinitrilotetracético) como anticoagulante, na concentração de 1,5 mg/ml de sangue (14).

O material foi obtido após esclarecimentos sobre os procedimentos adotados e a finalidade do trabalho.

MÉTODOS

I - ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

1. Hematimetria

A determinação do número de hemácias, da concentração de hemoglobina, do hematócrito e dos índices hematimétricos VCM e HCM foi feita em contador eletrônico (Coulter Counter Modelo Ssr), imediatamente após a coleta das amostras.

2. Análise das Hemoglobinas

a. Preparo dos Hemolisados

Uma alíquota de cerca de 2 ml do sangue colhido com anticoagulante foi utilizada na preparação dos hemolisados livres de estroma. Assim, o sangue foi lavado 3 vezes com solução salina fisiológica (NaCl 0,9%), e hemolisado pela adição de 1 volume de água destilada e 0,5 volume de tetracloreto de carbono para cada volume de células. Após vigorosa agitação e centrifugação (3.000 rpm, por 20 minutos), a camada superior foi recolhida em um tubo de ensaio, onde recebeu uma gota de KCN 1% (para conservação). Esta camada constitui o hemolisado livre de estroma (14).

b. Determinação do Padrão Eletroforético

Os hemolisados foram analisados através de eletroforese em fitas de acetato de celulose, em tampão Tris-EDTA-borato, pH 8,6 (apêndice 1), por 50 minutos, a 220 volts (118). As alterações hemoglobínicas verificadas em pH alcalino foram confirmadas em gel de ágar 1%, em placas de 9x12 cm, em tampão citrato, pH 5,8 (apêndice 1), a 45 mA, 4°C, corado com solução de benzidina (apêndice 1) (118).

c. Confirmação da Hb S

Os hemolisados que apresentaram Hb S na eletroforese foram ainda submetidos ao teste de solubilidade das hemoglobinas, que consistiu da adição de 0,1 ml do hemolisado a 5 ml de tampão fosfato 2,35M, na presença de ditionito de sódio a 1%. Após filtração, foi determinada a absorvância do filtrado a 540 nm (125)

d. Quantificação das Hemoglobinas

A Hb A₂ foi quantificada após eletroforese de 10 µl do hemolisado em acetato de celulose, em tampão Tris-EDTA-borato, pH 8,6. A banda correspondente foi recortada e a hemoglobina eluída em 3 ml de tampão, enquanto as demais hemoglobinas

presentes foram eluídas juntamente, em 15 ml de tampão. Após a eluição, foram medidas as absorvâncias das duas frações a 415 nm e calculada a percentagem correspondente à Hb A₂. A Hb S foi quantificada de modo similar nos portadores dessa alteração (118).

A quantificação da Hb Fetal foi realizada pelo método da desnaturação alcalina, que consistiu da adição de 0,2 ml de hemolisado a 3,2 ml de solução de hidróxido de sódio 0,083N. Após 1 minuto, foram acrescentados 6,8 ml de solução de sulfato de amônio saturado a 50%. Após filtração, foi determinada a absorvância do filtrado a 415 nm (88).

e. Pesquisa de Hb H

Duas gotas de sangue total foram incubadas com 1 gota de azul brilhante de cresil a 1% em salina-citrato, por 1 hora ou mais, a 37°C, após o que foram preparados esfregacos, examinados à microscopia comum (pesquisa de corpos de inclusão de Hb H) (14). Da mesma forma, 1 gota de sangue total foi incubada com 2 gotas de solução de violeta de metila 0,5% (pesquisa de corpos de Heinz, para hemoglobinas instáveis), observados à microscopia de fase (14). Além disso, hemolisados preparados apenas pela adição de 1 volume de água, sucessivos congelamentos e descongelamentos e centrifugação a 15.000 rpm, foram submetidos a eletroforese em acetato de celulose, em tampão Fosfato, pH 6,5 (apêndice 1), por 30 minutos, a 190

volts, específico para as hemoglobinas Bart's e H. A coloração foi feita com benzidina (14,118).

Em todos os casos, foram também realizadas contagens de reticulócitos no sangue periférico, e o exame morfológico dos esfregaços sanguíneos corados com Leishman (14).

II - ANÁLISE DE DNA

1. Extração de DNA de Sangue Total

Um volume de cerca de 15 ml de sangue foi inicialmente centrifugado (2.000 rpm, por 10 minutos), para separação do plasma. As hemácias foram então lisadas pela adição de um volume de tampão hipotônico (tampão de lise das hemácias) (apêndice 1). Após centrifugação (2.000 rpm, por 15 minutos), o sobrenadante foi cuidadosamente retirado, descartado, e o sedimento, constituído de leucócitos, foi ressuspensionado em 30 ml desse mesmo tampão. Essa operação foi repetida até a completa lise das hemácias.

A lise dos leucócitos ocorreu através do gotejamento lento de 10 ml do tampão de lise de glóbulos brancos (apêndice 1), seguido da adição de 1 ml de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% . Após demorada agitação por inversão, o material foi incubado a 37°C por 10 minutos.

O DNA dos leucócitos lisados foi então extraído pela adição de 15 ml de uma mistura de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25: 24: 1) (apêndice 1). Após agitação por inversão, e centrifugação (5.000 rpm, por 20 minutos), a camada superior foi cuidadosamente transferida para outro tubo, e a etapa repetida. A última extração foi feita somente com 5 ml de clorofórmio - álcool isoamílico (24: 1). A precipitação do DNA deu-se pela adição de 25 ml de etanol absoluto a -20°C , permanecendo o material nesta temperatura por cerca de 12 horas, após o que foi lavado 2 vezes com 5 ml de etanol aquoso (70%), igualmente gelado, e seco ao ar. O DNA foi então ressuspendido em 1 ml de tampão TE (Tris-EDTA, 10mM : 1 mM, pH 8,0), e a solução transferida para um tubo plástico de 1,5 ml. A concentração foi determinada em espectrofotômetro, a 260 nm, sabendo-se que uma unidade de densidade ótica corresponde a uma solução contendo 50 ug/ml de DNA. A pureza foi verificada através da relação entre as leituras feitas a 260 e 280 nm ($260 / 280$) (satisfatória quando entre 1,8 e 2,0) (15).

2. Digestão

Cerca de 10 ug de DNA foram digeridas com o emprego da enzima de restrição Bam HI (BRL), em excesso de 5 vezes (5 unidades de enzima / 1 ug de DNA) e incubação a 37°C por 16 horas, seguindo-se as especificações do fabricante. Após a digestão, um volume correspondente a 0,5 ug de DNA foi aplicado

em mini-gel de agarose 0,8% (5cm x 0cm), em tampão TEB (Tris-EDTA-Borato), pH 8,0 (apêndice 1), por 2 horas, a 80 volts, posteriormente corado com solução de brometo de etídio (0,6 ug/ml), para controle de qualidade da digestão. A distribuição homogênea dos fragmentos, formando um rastro no gel, indica digestão completa. Caso contrário, 10 a 20 unidades de enzima eram acrescentadas, e a reação prolongada por mais 4 horas. O DNA digerido foi então precipitado pela adição de 0,5 ul de RNA de levedura em solução (100 ug/ml), 0,2M de acetato de sódio e 2,5 volumes de etanol absoluto (a -20°C). O material foi mantido nessa temperatura durante cerca de 12 horas, e a seguir lavado 2 vezes com 0,5ml de etanol a 70%, seco ao ar, e ressuspendido em 25 ul de TE.

Todos os casos de padrão de DNA alterado, foram confirmados por subsequente digestão com a enzima Bgl II (BRL), em excesso de 3 vezes, em condições idênticas às da primeira enzima utilizada (15,71).

3. Separação Eletroforética dos Fragmentos

Os fragmentos de DNA resultantes da digestão foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose (BRL, cat.n. 5510UA) 0,8% (15cm x 20cm), em tampão TEB, pH 8,0, por 24 horas, a 60 volts. Para serem aplicadas no gel, as amostras de DNA e o marcador de peso molecular (1 ug de DNA de fago lambda digerido com Hind III - Pharmacia, cat.n. 27-4048-01)

receberam 4 μ l de solução de azul de bromofenol (0,25% de bromofenol, 50% de glicose). Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com solução de brometo de etídio para visualização do DNA em transiluminação com luz ultra-violeta (15,71).

4. Transferência ("Southern Blot")

Antes de sua transferência para a membrana de nitrocelulose (Millipore - HATF 151 50), o DNA contido no gel recebeu um tratamento que consistiu de uma "depuração", seguida de desnaturação e neutralização. A depuração foi feita pela incubação do gel, durante 5 minutos, em solução ácida (HCl 0,1N), sob agitação, a desnaturação pela incubação em solução alcalina (apêndice 1), 2 vezes, 15 minutos cada vez, e a neutralização através da incubação em solução neutralizante (apêndice 1), por 45 minutos e depois por 1 hora. As soluções foram usadas em volume de 250 ml, e a cada mudança de solução o gel foi lavado com água bidestilada estéril.

Resumidamente, o gel foi colocado sobre pontes de papel de filtro (Whatmann 3MM), cujas pontas estavam imersas em solução de transferência (apêndice 1), contida em uma cuba de vidro. Sobre o gel foi colocada a membrana, previamente embebida em água, e as bordas excedentes do gel foram isoladas com filme de pvc para evitar passagem direta da solução. Sobre a membrana de nitrocelulose foram colocadas 2 folhas de papel

Whatmann (em tamanho idêntico ao da membrana), embebidas na solução de transferência, e uma grande quantidade de papel absorvente, sendo o conjunto pressionado por um peso homogeneamente distribuído. Esse sistema permaneceu montado por cerca de 20 horas, após o que o nitrocelulose foi seco ao ar, envolto em papel Whatmann, e mantido a 80°C, por 2 horas, em estufa a vácuo, para fixação do DNA. As membranas foram estocadas em dessecador, à temperatura ambiente. Após o desmonte do sistema de transferência, o gel foi novamente corado, para verificação da transferência completa do DNA (101)

5. Hibridização

a. Preparo da sonda

A sonda correspondente ao gene da globina alfa (sonda alfa), é um fragmento genômico de 1,5 Kb de DNA, inserido no plasmídeo pSV01 (vetor), usado na transformação da bactéria E.coli (76). Para produção em larga escala, as células previamente transformadas foram amplificadas através de cultura em meio Luria-Bertani (LB) (apêndice 1) contendo o antibiótico tetraciclina (25 ug / ml), e incubação a 37°C em banho-maria com agitação, por cerca de 16 horas. Após crescimento, a cultura foi centrifugada (4.000 rpm, 10 minutos, a 4°C), o sobrenadante descartado e o sedimento celular lavado com tampão

STE (tampão TE contendo 0,1M de cloreto de sódio) Em seguida, procedeu-se à lise alcalina das células. Assim, estas foram tratadas com 10 ml da solução de lise I (apêndice 1), contendo 5 mg/ml de lisozima (repouso à temperatura ambiente, por 5 minutos) e com 20 ml da solução de lise II (apêndice 1). Após cuidadosa agitação por inversão, o material foi deixado em banho de gelo por 10 minutos, recebendo em seguida 15 ml de solução de acetato de potássio 5M (acetato de potássio 3M, ácido acético glacial 2M, pH 4,8), gelada. Nova agitação por inversão, seguida de banho de gelo por 10 minutos, e centrifugação (20.000 rpm, 20 minutos, a 4°C) para separação do DNA celular e restos bacterianos, que precipitam. Ao sobrenadante foram então adicionados 0,6 volumes de isopropanol. Após 15 minutos à temperatura ambiente, a solução foi centrifugada (7.000 rpm, 30 minutos), o sobrenadante descartado, e o sedimento, constituído de DNA plasmidial, lavado com etanol a 70%, à temperatura ambiente. Após secagem a vácuo, o DNA foi dissolvido em TE (200 a 400 ul) e sua concentração determinada a 260 nm. Cerca de 1 ug desse DNA foi aplicada em mini-gel, onde o aparecimento de no máximo 3 bandas (referentes ao DNA "super-coil", circular e linear) indicam uma boa extração (71).

O fragmento correspondente à sonda alfa foi então obtido através da técnica de eletroeluição, após digestão do DNA plasmidial pela enzima PST I (BRL), em excesso de 3 vezes, a 37°C, por cerca de 16 horas, e separação eletroforética em gel

de agarose 1%, preparado com 50 ml de tampão TEB, pH 8,0, contendo 5 µl de solução de brometo de etídio (8 mg/ ml). A corrida foi feita no mesmo tampão, a 80 volts. O fragmento foi recolhido em tampão TE, o brometo de etídio removido por extração com N-butanol saturado em água, e a purificação feita através de passagem em micro-coluna (1 ml) de Sephadex G-50 (Pharmacia - cat.n.17.0573-01), equilibrada com TE. O DNA foi então precipitado pela adição de 0,2M de acetato de sódio e 2,5 volumes de etanol absoluto (12 horas, a -20°C), ressuspendido em tampão Tris-EDTA 5mM: 0,1mM, e sua concentração estimada em mini-gel, em paralelo a quantidades conhecidas de DNA de fago lambda não digerido (71,76)

b. Marcação da Sonda

A sonda (300 a 500 ng) foi marcada com alfa-³²P-dCTP (Amersham) pela técnica de "nick translation"; para a reação, foi utilizado o kit da BRL (cat.n.8160SB), e os procedimentos adotados seguiram as especificações do fabricante. Encerrada a reação, foi realizada uma extração por fenol-clorofórmio, seguida de outra somente com clorofórmio. A sonda marcada foi então purificada em micro-coluna de Sephadex G-50, equilibrada com tampão STE. A percentagem de incorporação de nucleotídeos marcados à sonda foi medida através de cintilografia, sendo a média de resultados obtidos igual a $9,0 \times 10^7$ cpm/ug de DNA. Para desnaturação, a sonda foi fervida durante 10 minutos,

sendo imediatamente colocada em gelo picado para evitar renaturação (15).

c. Hibridização e Autoradiografia

As membranas foram colocadas em sacos plásticos, com 15 a 20 ml de solução de pré-hibridização (apêndice 1); as bolhas foram cuidadosamente retiradas e o saco plástico selado e incubado a 42°C por um mínimo de 4 horas. Esta solução foi descartada, e substituída por 5 ml de solução de hibridização (apêndice 1), contendo a sonda marcada (42°C, por 18 horas). Após a hibridização, as membranas foram lavadas 2 vezes com tampão de lavagem 1 (apêndice 1), à temperatura ambiente, por 15 minutos, e 2 vezes com tampão de lavagem 2 (apêndice 1), em temperatura entre 55-60°C, por 30 minutos. As membranas foram então secas ao ar, envolvidas em filme de PVC para proteção, e colocadas em cassetes com filme de raio-X (Ortho-M-100, Kodak cat.n.160.88.50) e intensificadores Dupont Lightning-Plus, a -70°C, por um tempo de exposição de no mínimo 4 dias, após o que o filme foi revelado (15).

A sonda genômica correspondente ao gene alfa-1 nos foi gentilmente cedida pelo Dr. B. G. Forget, da Yale University School of Medicine (New Haven, USA).

III. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Inicialmente, a análise estatística foi voltada para a comparação da proporção de heterozigotos da talassemia alfa⁺ detectada anteriormente pela autora (100) através do método eletroforético e aquela aqui verificada, através da análise de DNA. Em seguida, essa frequência, considerada real, foi comparada à estimada para a população em estudo a partir dos homozigotos detectados pelo método eletroforético (frequência esperada). Estas comparações se deram através de teste de Qui-Quadrado (χ^2) (6).

Para a comparação das variáveis hematológicas HM, Hb, Ht, VCM, HCM, % de Hb A₂, % de Hb F e % de reticulócitos, entre os indivíduos normais e os heterozigotos da talassemia alfa⁺, foi primeiramente realizada a análise de variância, através do teste de Fisher (Snedecor, 1934), seguida da comparação das médias amostrais através do "teste t" (Student, 1908). Como a distribuição das dosagens de Hb F obtidas no primeiro grupo não foi normal, esse parâmetro, particularmente, foi comparado através de teste não paramétrico (Wilcoxon) (6).

As análises estatísticas foram realizadas com o emprego do programa "Microstat", em computador pessoal (PC - SID 502)

RESULTADOS

A figura 7 apresenta os resultados obtidos a partir da hibridização da sonda correspondente ao gene da globina alfa, com o DNA de um indivíduo normal, de um heterozigoto da talassemia alfa*, de um homozigoto e de um indivíduo que possui triplicação desse gene em um dos cromossomos, enquanto o outro é normal. A primeira digestão foi feita com o emprego da enzima Bam HI, e a confirmação do padrão de bandas com a enzima Bgl II. Conforme demonstrado na Figura 6, no primeiro caso (Bam HI) os indivíduos normais apresentam, na autoradiografia, um único fragmento, de 14 Kb de DNA, enquanto os heterozigotos apresentam dois, um de 14 Kb, referente ao cromossomo normal, e um de 10,5 Kb, referente ao cromossomo com deficiência gênica. Um único fragmento de 10,5 Kb, indica homozigose dessa alteração e cromossomos com três genes alfa correspondem a fragmentos de 17,7 Kb. No caso da Bgl II, os indivíduos normais apresentam dois fragmentos, um de 12,6 e um de 7,4 Kb, enquanto os heterozigotos, além destes, apresentam um outro, de 16 Kb, que corresponde à perda do sítio de restrição da enzima, entre os genes alfa, no cromossomo com deficiência gênica. Assim, os homozigotos da talassemia alfa* apresentam apenas esse último fragmento. A triplicação dos genes alfa também leva ao aparecimento de três bandas, as duas encontradas nos normais e uma correspondente ao gene extra, de 3,7 Kb. Todos os casos

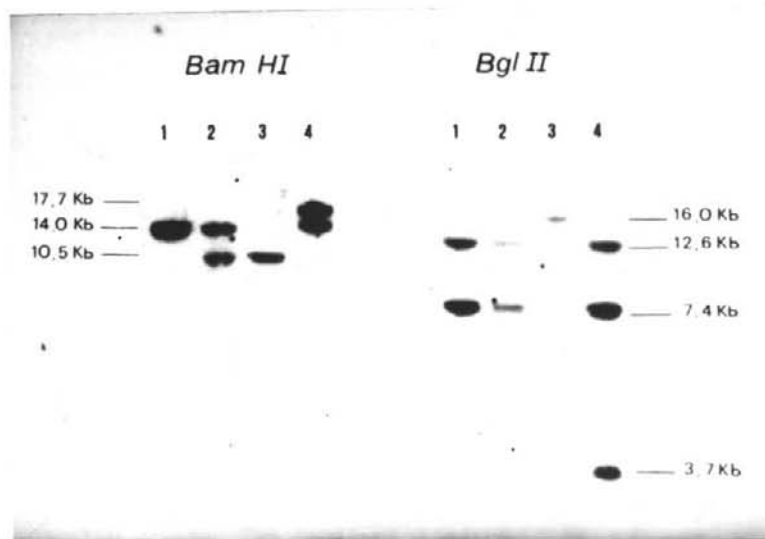


Figura 7 - AUTORADIOGRAFIA DA HIBRIDIZAÇÃO DE DNAs DIGERIDOS COM AS ENZIMAS Bam HI E Bgl II, COM SONDA CORRESPONDENTE AO GENE DA GLOBINA ALFA.

- 1 - indivíduo normal
- 2 - heterozigoto da talassemia alfa⁺
- 3 - homozigoto da talassemia alfa⁺
- 4 - heterozigoto da triplicação do gene alfa

aqui detectados envolveram ganho ou perda de um fragmento de 3,7 Kb de DNA.

Os diferentes genótipos encontrados entre os 47 indivíduos analisados e suas respectivas proporções estão demonstrados na Tabela 1. A comparação entre a proporção de heterozigotos verificada por análise de DNA e aquela detectada pelo método eletroforético, mostrou que elas diferem significativamente (Tabela 2). Por outro lado, a frequência de heterozigotos estimada a partir dos homozigotos detectados na eletroforese de hemoglobina (frequência esperada) não diferiu daquela aqui encontrada, considerada real (frequência observada). Estes dados encontram-se na Tabela 3.

As alterações hemoglobínicas detectadas e suas associações com o genótipo relacionado aos genes alfa estão globalizadas na Tabela 4. A tabela mostra que 4 indivíduos apresentaram heterozigose da Hb S, sendo 2 deles também heterozigotos da talassemia alfa⁺, 1 deles portador de genes alfa triplicados, e 1 com genótipo normal.

Com relação à comparação das variáveis hematológicas, o teste de Fisher demonstrou que as variâncias dos dois grupos analisados (normais e heterozigotos) não diferem significativamente em nenhuma das variáveis com distribuição normal, enquanto o teste t revelou não haver diferença significativa das médias quanto à concentração de Hb, o Ht, a percentagem de Hb A₂, de Hb F e de reticulócitos. O mesmo não ocorreu com o número de hemácias e os índices hematimétricos

TABELA 1 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS ENCONTRADAS
A PARTIR DA ANÁLISE DE DNA DE 47
INDIVÍDUOS NEGRÓIDES

GENÓTIPOS	FREQUÊNCIA
$-\alpha/\alpha\alpha$	10 (21,3%)
$-\alpha/-\alpha$	01 (2,1%)
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	03 (6,4%)
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	33 (70,2%)
TOTAL	47

TABELA 2 - COMPARAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA DE HETEROZIGOTOS α^+ VERIFICADA ANTERIORMENTE ATRAVÉS DO MÉTODO ELETROFORÉTICO E A OBSERVADA NO PRESENTE TRABALHO PELA ANÁLISE DE DNA

	HETEROZIGOTOS DETECTADOS	DEMAIS CASOS	TOTAL
ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA	33 (10,3%)	287 (89,7%)	320
ANÁLISE DE DNA	10 (21,3%)	37 (78,7%)	47
TOTAL	43	324	367

$$\chi^2_{(1)} = 4,763, P = 0,03$$

TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA DE HETEROZIGOTOS
 α* OBSERVADA PELA ANÁLISE DE DNA E A ESTIMADA
 ANTERIORMENTE A PARTIR DOS HOMOZIGOTOS DETECTA-
 DOS NA ELETROFORESE (FREQUÊNCIA ESPERADA)

	HETEROZIGOTOS	NÃO HETEROZIGOTOS	TOTAL
FREQUÊNCIA OBSERVADA	10 (21,3%)	37 (78,7%)	47
FREQUÊNCIA ESPERADA	10,34 (22%)	36,66 (78%)	47
TOTAL	20,34	73,66	94

$$\chi^2_{(1)} = 0,011; 0,95 > P > 0,90$$

TABELA 4 - ALTERAÇÕES HEREDITÁRIAS DAS HEMOGLOBINAS
DETECTADAS EM 47 INDIVÍDUOS NEGRÓIDES

PADRÃO DE Hb	GENÓTIPO α	FREQUÊNCIA
AA	$-\alpha / \alpha\alpha$	08 (17,0%)
AA	$-\alpha / -\alpha$	01 (2,1%)
AA	$\alpha\alpha\alpha / \alpha\alpha$	02 (4,3%)
AS	$\alpha\alpha / \alpha\alpha$	01 (2,1%)
AS	$-\alpha / \alpha\alpha$	02 (4,3%)
AS	$\alpha\alpha\alpha / \alpha\alpha$	01 (2,1%)
AA	$\alpha\alpha / \alpha\alpha$	32 (68,1%)
TOTAL		47

VCM e HCM, onde o teste mostrou, como esperado, haver diferença significativa, no primeiro caso (HM), a média obtida entre os talassêmicos foi significativamente maior, enquanto nos outros dois (VCM e HCM), as médias dos talassêmicos foram significativamente menores que as dos normais. As distribuições individuais destas três variáveis, nos dois grupos comparados, estão representadas nas figuras 8, 9 e 10, respectivamente. A Hb F, comparada através de teste não paramétrico, não diferiu entre os dois grupos analisados. A Tabela 5 relaciona as características hematológicas dos indivíduos com alterações dos genes alfa e a Tabela 6 apresenta a comparação das médias obtidas entre os indivíduos normais e os heterozigotos. Ambas se encontram no Apêndice 2.

As pesquisas de Hb H e de corpos de Heinz foram negativas em todos os casos, inclusive na homozigose da talassemia alfa⁺, o exame morfológico dos esfregaços sanguíneos dos talassêmicos mostrou normalidade ou apenas discreta microcitose.

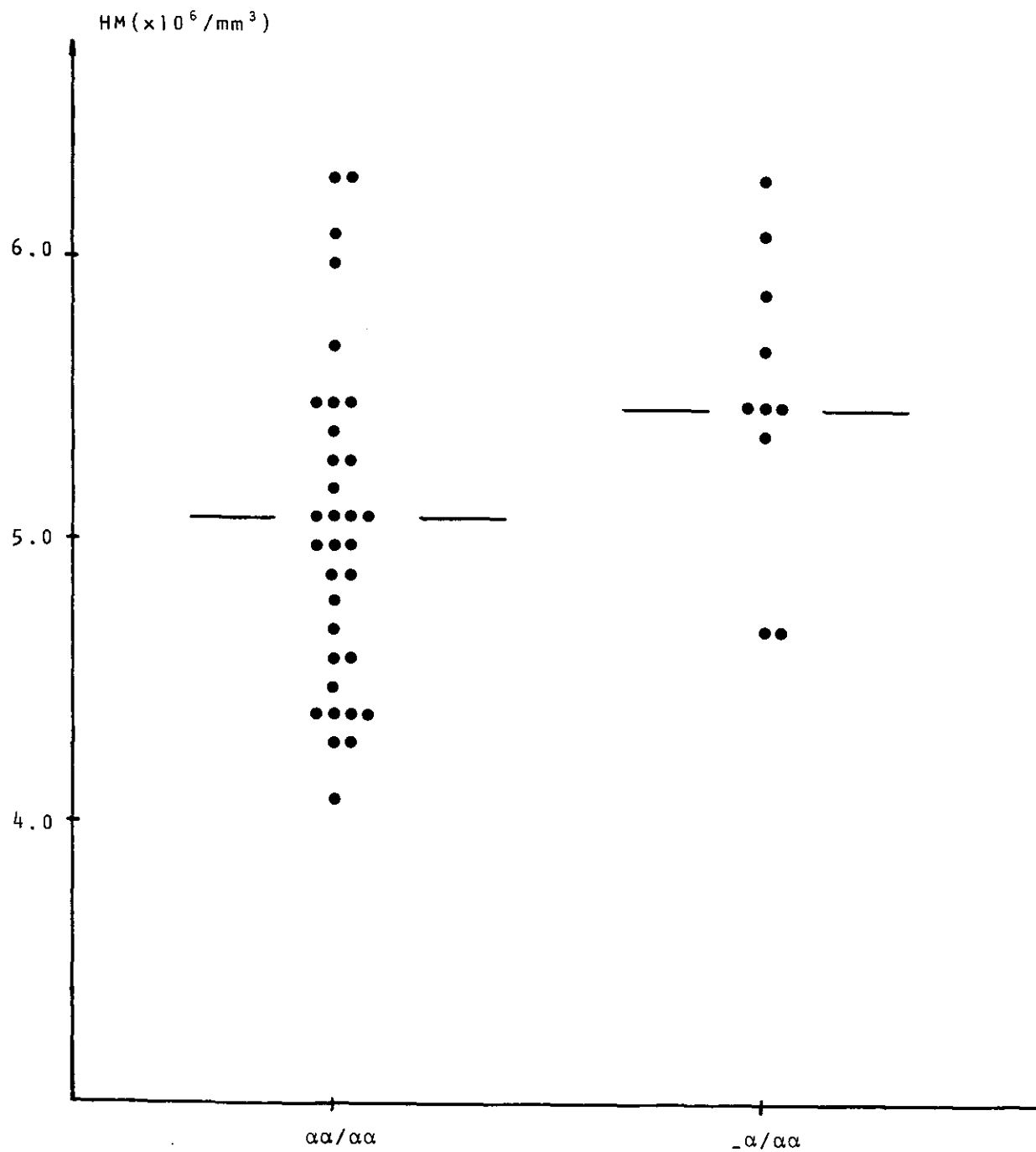


Figura 8 - NÚMERO DE HEMÁCIAS DAS AMOSTRAS DE SANGUE DOS INDIVÍDUOS NORMAIS ($\alpha\alpha / \alpha\alpha$) E DOS HETEROZIGOTOS DA TALASSEMIA ALFA* ($\alpha / \alpha\alpha$)

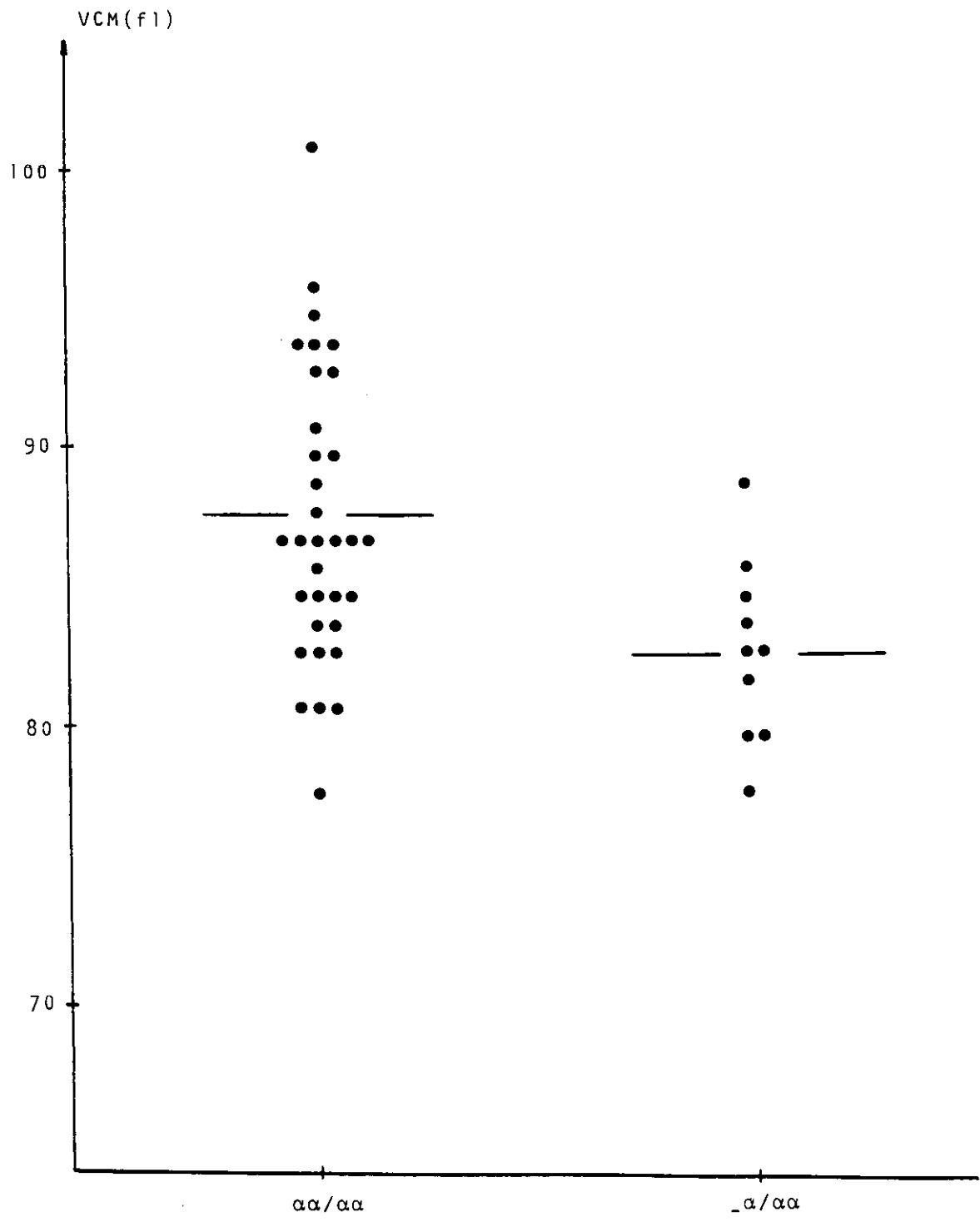


Figura 9 - VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO DAS AMOSTRAS DE SANGUE DOS INDIVÍDUOS NORMAIS (αα/αα) E DOS HETEROZIGOTOS DA TALASSEMIA ALFA* (-α/αα)

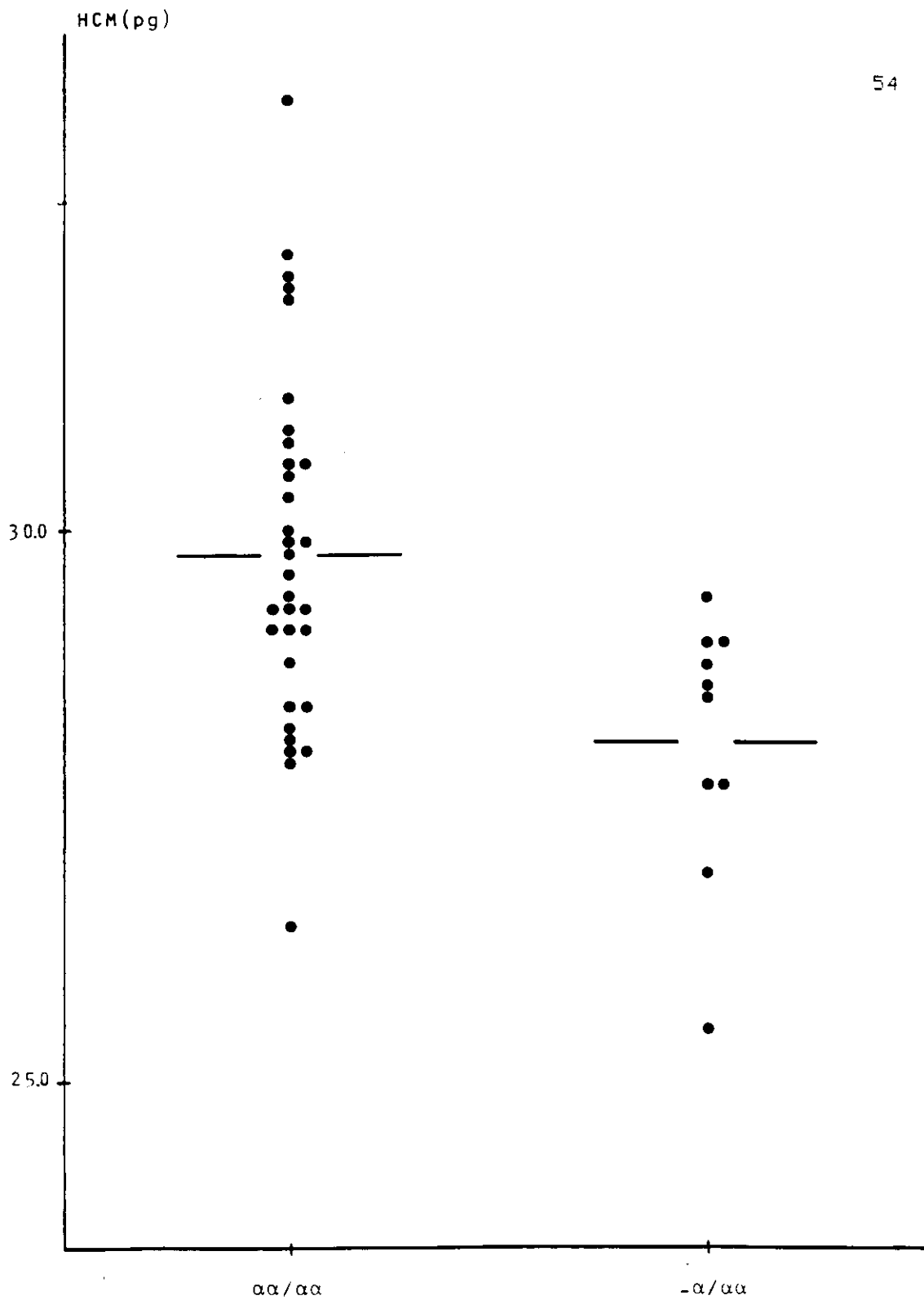


Figura 10 - HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA DAS AMOSTRAS DE SANGUE DOS INDIVÍDUOS NORMAIS ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) E DOS HETEROZIGOTOS DA TALASSEMIA ALFA+ ($\alpha^+/\alpha\alpha$)

DISCUSSÃO

O período neonatal foi, por muito tempo, considerado o período apropriado para o reconhecimento daquelas formas de talassemia alfa que não apresentam manifestações clínicas, através da correlação existente entre a quantidade de Hb Bart's e o provável genótipo alfa do indivíduo (47,49,64,78,92,116,117,119). Como, com a substituição das cadeias gama pelas cadeias beta, o nível de Hb Bart's diminui progressivamente após o nascimento, a determinação da prevalência da talassemia alfa, em muitas populações, foi feita inicialmente no período neonatal, pela estimativa do nível de Hb Bart's em sangue de cordão umbilical (12,27,31,32,34,41,48,78,79,87,89,90,92,100,112,117,127). O principal método empregado nesses estudos foi a eletroforese de hemoglobinas em acetato de celulose, em pH alcalino, sendo, ainda hoje, amplamente utilizado em triagens populacionais.

O grande avanço na biologia molecular, com o estudo dos genes e seus produtos, a partir da década de 70, não só possibilitou uma melhor compreensão das alterações moleculares envolvidas na talassemia alfa, como evidenciou a limitação do método diagnóstico através da Hb Bart's. Assim, Higgs e colaboradores (47,49), em dois diferentes estudos com recém-nascidos jamaicanos, empregando análise de DNA, verificaram que a Hb Bart's está sempre correlacionada com a presença de talassemia alfa, mas que nem todos os recém-nascidos com

talassemia alfa produzem níveis detectáveis dessa hemoglobina. De acordo com esses estudos, em recém-nascidos com deficiência de 2 genes alfa são observados, quase sempre, valores maiores que 2% de Hb Bart's, ao passo que sua ausência pode estar associada com genótipo normal ($\alpha\alpha / \alpha\alpha$) ou heterozigótico ($-\alpha / \alpha\alpha$). Os dados obtidos por Higgs foram posteriormente confirmados por outros levantamentos, em diversas populações, utilizando-se a mesma metodologia (46,81,93). Mais recentemente, Fei e colaboradores (1989) (27), analisando 481 recém-nascidos negros que não apresentaram, na eletroforese, quantidades significativas de Hb Bart's (1% ou mais), encontraram 100 portadores da talassemia alfa⁺. Destes, 99 eram heterozigotos, e 1 homozigoto.

Em estudo anterior realizado pela autora entre negróides da região de Campinas (SP) (100), a quantificação de Hb Bart's em sangue de cordão umbilical mostrou distribuição bimodal. A primeira distribuição modal se deu entre 1,5 e 3,8%, com frequência de 10,3%, e a segunda entre 5,9 e 10,0%, com frequência de 1,6% dos casos analisados. Como já referido, a partir destes últimos, considerados homozigotos da talassemia alfa⁺, foi calculada a frequência do haplótipo talassêmico ($-\alpha$) em 0,125. A partir dela, estimou-se a frequência esperada de heterozigotos para essa população (22%). Assim, considerando-se essa frequência haplotípica, mais de 50% dos casos de heterozigose não teriam sido detectados pelo método eletroforético. Os resultados agora obtidos pela análise direta

de DNA confirmaram a prevalência de heterozigotos α^+ na população estudada em 21,3% (10 em 47 indivíduos analisados), valor esse muito próximo do esperado segundo a lei de Hardy-Weinberg (100). Esse resultado confirma que, nessa população, a frequência do haplótipo $-\alpha^+$ pode ser estimada em 0,125, semelhante aos valores verificados em outras populações negróides, como nas populações negras americanas, africanas e da Jamaica (49,74), e ao obtido no estudo de 41 pacientes com anemia falciforme, realizado por Costa e colaboradores (1989) (13), em Ribeirão Preto (SP) (9/41, 22%). Além disso, esse estudo corrobora os dados anteriormente obtidos (100) que demonstram que a análise eletroforética de sangue de cordão umbilical, embora limitada no diagnóstico individual dos heterozigotos da talassemia α^+ , pode ser usada com confiabilidade em estimativas populacionais, desde que a frequência de heterozigotos seja devidamente corrigida, a partir da frequência gênica calculada segundo Hardy Weinberg. Os dados obtidos também ilustram a dificuldade de diagnóstico da talassemia α^+ , sendo a análise de DNA o método mais seguro na detecção dos heterozigotos. Esta metodologia permite, ainda, a caracterização da base molecular da talassemia. Na população aqui analisada, todos os casos detectados foram da deleção $-\alpha^{2.7}$. Apesar da elevada frequência desse tipo de alteração molecular, a deleção $-\alpha^{4.2}$, assim como a forma α^0 , embora não detectadas em nossa amostra, podem coexistir nessa população, com frequências reduzidas, devido ao alto grau

de miscigenação que a caracteriza.

Como ocorre com a talassemia beta e a hemoglobinopatia S, as mutações que originaram a talassemia alfa parecem ter sido selecionadas favoravelmente naquelas áreas onde a malária é endêmica, explicando sua elevada freqüência em populações originárias destas regiões (7,30), como é o caso da nossa população. Experimentos *in vitro* comprovaram que o crescimento do *Plasmodium falciparum* é marcadamente retardado em hemácias que contém Hb H, além destas células apresentarem maior propensão à fagocitose por monócitos do sangue periférico (54,123). No caso da forma alfa⁺, homo e heterozigótica, e em heterozigotos da forma alfa⁰, esta hipótese é baseada apenas em estudos epidemiológicos, e experimentos *in vitro* realizados recentemente demonstraram que a invasão e o desenvolvimento do *Plasmodium falciparum* em hemácias de portadores da talassemia alfa⁺ homozigótica são normais (70). Assim, em negros, onde a forma prevalente de talassemia é a alfa⁺, a correlação com a malária permanece sem comprovação experimental, pois a seleção favorável dos raros portadores da Doença da Hb H não poderia justificar a manutenção desse polimorfismo nessas populações.

Foi sugerido por Schmaier (98), em 1973, que valores de VCM diminuídos, ao nascimento, poderiam ter significado no diagnóstico das formas "assintomáticas" de talassemia alfa. Trabalhos subseqüentes demonstraram que, embora as médias possam diferir entre os diferentes genótipos, ocorre grande sobreposição individual com os valores encontrados entre os

normais (27,49,57). Em nosso estudo anterior (100), a comparação dos valores de Hb e dos índices VCM e HCM obtidos entre os homozigotos da talassemia alfa⁺, os heterozigotos e aqueles recém-nascidos nos quais a Hb Bart's não foi detectada, mostrou diferença significativa das médias do VCM e HCM, de grupo para grupo. Como o agrupamento foi feito segundo o percentual de Hb Bart's encontrado, o último grupo incluiu cerca de 50% dos heterozigotos presentes na amostra que, por outro lado, deixaram de fazer parte da determinação dos parâmetros estatísticos do seu próprio grupo. Para complementação do presente trabalho foram comparados HM, Hb, Ht, VCM, HCM, percentagens de Hb A₂, de Hb F, e de reticulócitos, entre os indivíduos com genótipo de heterozigose da talassemia alfa⁺ e os indivíduos normais. Os testes estatísticos revelaram que a Hb, o Ht, as percentagens de Hb A₂, de Hb F e de reticulócitos não diferem significativamente entre os dois grupos, ou seja, esses parâmetros não se correlacionam com a presença de talassemia alfa⁺. Por outro lado, a média do número de hemácias (HM) dos heterozigotos foi significativamente maior que a dos normais, enquanto o inverso ocorreu com o VCM e HCM, cujas médias foram significativamente menores. No entanto, a despeito das diferenças das médias, e em acordo com os outros estudos citados, neste e no trabalho anterior, a distribuição dos valores encontrados nos talassêmicos se incluiu na distribuição observada nos indivíduos normais. Assim, embora as médias

desses parâmetros permitam diferenciar os diferentes grupos, em casos individuais esta distinção não pode ser realizada.

Com relação à associação com outras hemoglobinopatias, Mears e colaboradores (74), em 1983, sugeriram que em populações negras africanas e americanas, a frequência da talassemia alfa⁺ poderia estar elevada em adultos heterozigotos e homozigotos da Hb S, quando comparada ao restante da população. A presença concomitante da talassemia alfa melhoraria a evolução clínica, prolongando a vida média dos pacientes com anemia falciforme, através dos mecanismos já descritos. Outros autores, no entanto, consideram discutíveis os efeitos benéficos originados pela associação destas duas hemoglobinopatias (4,82). Ballas e colaboradores (4), em 1989, verificaram uma correlação positiva entre a deficiência do gene alfa e a prevalência e a extensão da necrose avascular de fêmur e de úmero em portadores da anemia falciforme. A correlação se deu, provavelmente, em razão do aumento do hematócrito e, conseqüentemente, da viscosidade sanguínea, ocasionados pela presença de talassemia alfa. A comparação da frequência de heterozigotos alfa⁺ aqui obtida, em população normal, com aquela obtida por Costa e colaboradores (13) em 41 pacientes com anemia falciforme (22%), sugere que, em nossa população, a interação da talassemia alfa⁺ com a hemoglobinopatia S não teria efeito clínico significativo, pois as frequências são praticamente idênticas ($\chi^2_{(1)} = 0,006$; $P = 0,94$). Os dados, porém, não permitem uma conclusão definitiva, porque, além do pequeno número de indivíduos

analisados, a amostragem de pacientes com anemia falciforme, embora em sua maior parte negróide, não foi selecionada pela cor dos pacientes e, ainda, incluiu indivíduos de diferentes faixas etárias. Como se pode perceber, é na investigação das modificações na expressão clínica da anemia falciforme e da talassemia beta onde se dá a maior aplicação clínica do estudo da talassemia alfa⁺. Nesse sentido, somente a metodologia de análise de DNA possibilita a detecção, e, portanto, a investigação direta desta associação em pacientes adultos. Com relação à heterozigose da Hb S, foram aqui detectados quatro casos, dois deles também portadores da talassemia alfa⁺ heterozigótica e um da triplicação do gene alfa, ilustrando assim a frequente ocorrência destas interações na população negróide brasileira. A frequência de portadores do traço siciêmico entre os negróides com talassemia alfa⁺ (2/11, 18,2%), embora maior, não diferiu significativamente da observada na amostra examinada (4/47, 8,5%) ($\chi^2_{(1)}=0,899$; $P=0,34$), cujos valores foram compatíveis com outros encontrados em populações negróides do Sul e Sudeste brasileiros (91,109).

Com relação à frequência da triplicação do gene alfa, Goossens e colaboradores (39), em 1980, detectaram, em 280 negros americanos, apenas 2 heterozigotos (0,7%), ou seja, 2 cromossomos com genes alfa triplicados em 560 cromossomos. Fei e colaboradores (27) (1989), em trabalho já citado, encontraram 8 heterozigotos em 481 crianças negras analisadas (aproximadamente 1,7%). Embora dependentes da análise de um

número maior de indivíduos, nossos dados apontam para a possibilidade desta frequência ser maior em nossa população, pois foram encontrados 3 desses indivíduos entre os 47 analisados (6,4%) ($\chi^2_{(1)}=8,191$; $P=0,02$). Apesar deste evento ocorrer com a mesma frequência daquele em que o haplótipo talassêmico é originado, pois ambos resultam do mesmo "crossing over" desigual, a sua frequência nas populações estudadas é menor, provavelmente porque não está sujeito à pressão seletiva favorável da malária. No entanto, são poucos os estudos existentes sobre a triplicação do gene alfa, que só pode ser detectada com o desenvolvimento do método de análise do DNA. Pouco se sabe sobre sua frequência, expressão e sobre os efeitos que produz quando cursa em concomitância com outras hemoglobinopatias.

A população negra brasileira, oriunda de várias tribos de regiões litorâneas do Atlântico africano, é caracterizada por um elevado grau de miscigenação, com indígenas brasileiros e imigrantes europeus. No Estado de São Paulo, em particular, o componente europeu está representado principalmente pelos portugueses, italianos e espanhóis. No que se refere à talassemia alfa, nosso estudo anterior constituiu o primeiro levantamento realizado em uma população negróide no país. Com ele ficou demonstrada a elevada prevalência dessa alteração genética, estimada em 23,5% para essa população. O presente trabalho confirmou, através de uma metodologia mais segura e sensível, a estimativa feita anteriormente. Apesar das

peculiaridades da população negróide brasileira, os dados de frequência e o tipo de alteração molecular encontrada foram similares aos das demais populações negras estudadas. No entanto, a alta frequência da triplicação do gene alfa é conspícua. Assim, os resultados aqui apresentados apontam para a continuidade da investigação da talassemia alfa nesta população. Entre os vários aspectos a serem melhor estudados, podem ser incluídos a questão da frequência da triplicação do gene, a incidência da talassemia alfa nas demais sub-populações que compõem a população brasileira, a interação com variantes estruturais da hemoglobina e os efeitos de sua associação com a talassemia beta.

RESUMO E CONCLUSÕES

Com o objetivo de avaliar, através da análise de DNA, a frequência da talassemia alfa⁺ em uma população negróide brasileira, e compará-la com a frequência esperada, estimada anteriormente para essa população através de metodologia eletroforética (detecção e quantificação de Hb Bart's em sangue de cordão umbilical), 47 indivíduos negróides, escolhidos ao acaso na população normal, foram analisados.

Os resultados obtidos demonstraram 21,3% (10/47) de heterozigotos dessa forma de talassemia ($-\alpha/\alpha$) na amostra estudada, valor que não difere significativamente da frequência esperada (22%), confirmando assim a frequência do haplótipo talassêmico ($-\alpha$), calculada em 0,125. Todos os casos detectados apresentaram o haplótipo $-\alpha^{\text{D} \cdot 7}$ ("rightward deletion"). Também foram detectados 1 homozigoto ($-\alpha/-\alpha$), e 3 heterozigotos da triplicação do gene alfa ($\alpha\alpha\alpha/\alpha$), demonstrando a presença, não rara, do cromossomo $\alpha\alpha\alpha^{\text{ANTI-D} \cdot 7}$ nessa população.

A comparação dos dados hematológicos dos indivíduos normais com os heterozigotos da talassemia alfa⁺ mostrou que as médias do número de hemácias e dos índices VCM e HCM diferem significativamente entre esses dois grupos; a média é maior no primeiro caso (número de hemácias) e menor nos outros dois (VCM e HCM). No entanto, a distribuição dos valores não permite a identificação individual.

Com relação à associação com outras hemoglobinopatias, 2 heterozigotos apresentaram concomitantemente heterozigose da Hb S.

Esses resultados comprovam, através da análise direta dos genes da globina alfa, a elevada frequência da talassemia alfa* na população negroide estudada. Confirmam que a análise eletroforética, embora limitada na identificação individual dos heterozigotos, pode ser usada com confiabilidade em estudos populacionais, desde que a frequência obtida seja devidamente corrigida, com base nos homozigotos, cuja detecção, por esse método, é segura.

SUMMARY

In order to evaluate the frequency of deletion type alpha⁺ thalassemia in a Black Brazilian population, and compare it with the expected frequency, previously estimated by electrophoretic methodology, DNA from 47 black individuals, randomly selected from normal population, have been analysed.

The results demonstrated 21,3% (10/47) of heterozygous for thalassemia ($-\alpha / \alpha\alpha$) in the sample studied. This value was similar of the expected frequency (22%), corroborating the previously estimated frequency of thalassemic haplotype ($-\alpha$), of 0,125. All detected cases showed the $-\alpha^{3.7}$ haplotype ("rightward deletion"). There were detected 1 homozygous and 3 heterozygous for alpha gene's triplication ($\alpha\alpha\alpha / \alpha\alpha$), which suggest that the presence of the $\alpha\alpha\alpha^{ant1-3.7}$ chromosome in the studied population is not a rare event.

The comparison of hematological's data between normal individuals and alpha⁺ thalassemia heterozygous showed that the mean value of red cells count and VCM and HCM significantly differ among these 2 groups. However, the distribution of these values doesn't allow individual identification of affected persons.

Two heterozygous for alpha thalassemia were Hb S heterozygous.

Our results confirm, by direct analysis of alpha globin genes, the high prevalence of alpha⁺ thalassemia in the black population studied. The data strongly indicate that electrophoretic analysis, although limited in individual identification of heterozygous, may be applied in populational studies, provided that the gene frequency is properly corrected according by to homozygous frequency detected.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTAY, C., GRAVELY, M.E., JOSEPH, B.R. & WILLIAMS, D.F. Alpha - Thalassemia-2 and the Variability of Hematological Values in Children with Sickle Cell Anemia. *Pediatr Res*, 15 : 1093-1096, 1981.
2. ALTAY, C., RINGELHANN, B., YAWSON, G.I., BRUCE-TAGOE, A.A., KONOTEY-AHULU, F.I.D., JAMES, L., GRAVELY, M. & HUISMAN, T.H.J. Hemoglobin Alpha Chain Deficiency in Black Children with Variable Quantities of Hemoglobin Bart's at Birth. *Pediatr Res*, 11 (2): 147-152, 1977.
3. ANGLÉS CANO, E., ROBLES ARREDONDO, I., FERRER, V., GONZALEZ CONSTANDSE, R. & ORTIZ TREJO, J.F. Talassemia Alfa (Hemoglobinopatia H) en una Familia Mestiza Mexicana. *Sangre (Barcelona)*, 22 (3) : 366 - 376, 1977.
4. BALLAS, S.K., TALACKI, C.A., RAO, V.M. & STEINER, R.M. The Prevalence of Avascular Necrosis in Sickle Cell Anemia : Correlation with Alpha-Thalassemia. *Hemoglobin*, 13 (7&8) : 649 - 655, 1989.
5. BATE, C.M. & HUMPHRIES, G. Alpha-Beta Thalassaemia. *Lancet*, i (8020): 1031 - 1034, 1977.
6. BEIGUELMAN, B. *Curso Prático de Bioestatística*. Ribeirão Preto, Revista Brasileira de Genética, 1988.
7. BOWDEN, D.K., HIGGS, D.R., HILL, A.V.S., WEATHERALL, D.J. & CLEGG, J.B. Relative Roles of Genetic Factors, Dietary Deficiency, and Infection in Anaemia in Vanuatu, South-West Pacific. *Lancet*, (8463): 1025 - 1028, 1985.
8. BOWDEN, D.K., HILL, A.V.S., HIGGS, D.R., OPPENHEIMER, S.J., WEATHERALL, D.J. & CLEGG, J.B. Different Hematologic Phenotypes are Associated with the Leftward ($-\alpha^{4.2}$) and Rightward ($-\alpha^{3.7}$) Alpha⁺-Thalassemia Deletions. *J Clin Invest*, 79: 39 - 43, 1987.
9. BRITTENHAM, G., LOZOFF, B., HARRIS, J.W., KAN, Y.W., DOZY, A.M. & NAYUDU, N.V.S. Alpha Globin Gene Number: Population and Restriction Endonuclease Studies. *Blood*, 55 (4): 706 - 708, 1980.
10. BUNN, H.F. & FORGET, B.G. *Hemoglobin : Molecular, Genetic and Clinical Aspects*. Philadelphia, London, Toronto, Mexico City, Rio de Janeiro, Sydney, Tokyo, Hong Kong, W.B.Saunders Company, 1986.

11. COLMAN, N. Interaction of Alpha-Thalassemia and Homozygous Sickle Cell Disease. *New England J Med*, 307 (21): 1349, 1982.
12. COLOMBO, B. & MARTINEZ, G. Haemoglobinopathies Including Thalassaemia. Part 2: Tropical America. *Clinics in Haematology*, 10 (3): 730 - 756, 1981.
13. COSTA, F.F., TAVELLA, M.H. & ZAGO, M.A. Deletion Type Alpha-Thalassemia Among Brazilian Patients With Sickle Cell Anemia. *Rev Brasil Genet*, 12 (3): 605 - 611, 1989.
14. DACIE, J.V. & LEWIS, S.M. *Practical Haematology*. 6th edn. Churchill, Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, New York, 1984.
15. DAVIES, L., DIENER, M.D. & BATTEY, J.F. *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York, 1986.
16. DAVIS Jr., J.R., DOZY, A.M., LUBIN, B., KOENIG, H.M., PIERCE, H.I., STAMATOYANNOPOULOS, G. & KAN, Y.W. Alpha-Thalassemia in Black is Due to Gene Deletion. *Am J Hum Genet*, 31: 569 - 573, 1979.
17. DE CELAUER, K., HIGGS, D.R., HAYES, R.J., SERJEANT, B.E. & SERJEANT, G.R. Alpha-Thalassemia Reduces the Hemolytic Rate in Homozygous Sickle-Cell Disease. *New England J Med*, 307 (3): 189 - 190, 1983.
18. DI RIENZO, A., NOVELLETTO, A., ALIQUO, M.C., SIANCO, I., TAGARELLI, A., BRANCATI, C., COLOMBO, B. & FELICETTI, L. Molecular Basis for HbH Disease in Italy: Geographical Distribution of Deletional and nondeletional Alpha - Thalassemia Haplotypes. *Am J Hum Genet*, 39: 631 - 639, 1986.
19. DOZY, A.M., KAN, Y.W., EMBURY, S.H., MENTZER, W.C., WANG, W.C., LUBIN, B., DAVIS Jr, J.R. & KOENIG, H.M. Alpha Globin Gene Organization in Blacks Precludes the severe form of alpha-thalassemia. *Nature*, 280: 605 - 607, 1979.
20. ECHAVARRIA, R.A., MOLINA, V.C. & ANGEL, S.M. Enfermedad por Hemoglobina H. Tercera Forma de Alfa-Talasemia Encontrada en Colombia. *Sangre (Barr)*, 21 (1): 43 - 53, 1976.

21. EMBURY, S.H. The Interaction of Coexistent Alpha-Thalassemia and Sickle Cell Anemia. A Model for the Clinical and Cellular Results of Diminished Polymerization? *Ann NY Acad Sci*, 445: 37 - 45, 1985.
22. EMBURY, S.H. The Different Types of Alpha-Thalassemia-2: Genetic Aspects. *Hemoglobin*, 12 (5&6): 445 - 453, 1988.
23. EMBURY, S.H., CLARK, M.R., MONROY, G. & MOHANDAS, N. Concurrent Sickle Cell Anemia and Alpha-Thalassemia Effect on Pathological of Sickle Erythrocytes. *J Clin Invest*, 73 (1): 116 - 123, 1984.
24. EMBURY, S.H., DOZY, A.M. & KAN, Y.W. Molecular Mechanisms in Alpha-Thalassemia: Racial Differences in Alpha-Globin Gene Organization. *Ann NY Acad Sci*, 344: 31 - 40, 1980.
25. EMBURY, S.H., DOZY, A.M., MILLER, J., DAVIS Jr, J.R., KLEMAN, K.M., PRESSLER, H., VICHINSKY, E., LANDE, W.N., LUBIN, B.H., KAN, Y.W. & MENTZER, W.C. Concurrent Sickle-Cell Anemia and Alpha-Thalassemia: Effect on Severity of Anemia. *New England J Med*, 306: 270 - 274, 1982.
26. EMBURY, S.H., GHOLSON, M.A., GILLETTE, P. & RIEDER, R.F. The Leftward Deletion Alpha-Thal-2 Haplotype in a Black Subject with Hemoglobin SS. *Blood*, 65 (3): 769-771, 1985.
27. FEI, Y.J., KUTLAR, F., HARRIS, H.F., WILSON, M.M., MILANA, A., SCIACCA, P., SCHILIRO, G., MASALA, B., MANCA, L., ALTAY, C., GURGEY, A., PABLOS, J.M., VILLEGAS, A. & HUISMAN, T.H.J. A Search for Anomalies in the ζ , α , β , γ and δ Globin Gene Arrangements in Normal Black, Italian, Turkish, and Spanish Newborns. *Hemoglobin*, 13 (1): 45 - 65, 1989.
28. FELICE, A.E., ALTAY, C.A., MILNER, P.F. & HUISMAN, T.H.J. The Occurrence and Identification of Alpha-Thalassemia-2 among Hemoglobin S Heterozygotes. *Am J Clin Pathol*, 76 (1): 70 - 73, 1981.
29. FELICE, A.E., WEBBER, B., MILLER, A., MAYSON, S.M., HARRIS, H.F., HENSON, J.B., GRAVELY, M.E. & HUISMAN, T.H.J. The Association of Sickle-Cell Anemia with Heterozygous and Homozygous Alpha-Thalassemia-2: In Vitro Hb Chain Synthesis. *Am J Hematol*, 6: 91 - 106, 1979.

30. FLINT, J., HILL, A.V.S., BOWDEN, D.K., OPPENHEIMER, S.J., SILL, P.R., SERJEANTSON, S.W., BANA-KOIRI, J., BHATIA, K., ALPERS, M.P., BOYCE, A.J., WEATHERALL, D.J. & CLEGG, J.B. High Frequencies of Alpha-Thalassaemia are the Result of Natural Selection by Malaria. *Nature*, 321 (19): 744 - 750, 1986.
31. FOLAYAN-ESAN, G.J. The Thalassaemia Syndromes in Nigeria. *Br J Haematol*, 19: 47 - 56, 1970.
32. FOLAYAN-ESAN, G.J. Haemoglobin Bart's in Newborn Nigerians. *Br J Haematol*, 22: 73 - 86, 1972.
33. FORGET, B.G. Molecular Genetics of Human Hemoglobin Synthesis. *Ann Intern Med*, 91 (4): 605 - 616, 1979.
34. FRIEDMAN, S., ATWATER, J., GILL, F.M. & Schwartz, E. Alpha-Talassemia in Negro Infants. *Pediatr Res*, 8: 955 - 959, 1974.
35. FUCHARDEN, S., WINICHAGOON, P. & THONGLAIRUAM, V. Beta-Thalassaemia Associated with Alpha-Thalassaemia in Thailand. *Hemoglobin*, 12 (5&6): 581 - 592, 1988.
36. GALANELLO, R., MACCIONI, L., RUGGERI, R., PERSEU, L. & CAO, A. Alpha Thalassaemia in Sardinian Newborns. *Br J Haematol*, 58: 361 - 368, 1984.
37. GALANELLO, R., RUGGERI, R., PAGLIETTI, E., ADDIS, M., MELIS, M.A. & CAO, A. A Family with Segregating Triplicated Alpha Globin Loci and Beta Thalassaemia. *Blood*, 62 (5): 1035 - 1040, 1983.
38. GONZALEZ-REDONDO, J.M., DIAZ-CHICO, J.C., MALCORRA-AZPIAZU, J.J., BALDA-AGUIRRE, M.I. & HUISMAN, T.H.J. Characterization of a Newly Discovered Alpha-Thalassaemia-1 in Two Spanish Patients with HbH Disease. *Br J Haematol*, 70: 459 - 463, 1988.
39. GOOSSENS, M., DOZY, A.M., EMBURY, S.H., ZACHARIADES, Z., HADJIMINAS, M.G., STAMATOYANNOPOULOS, G. & KAN, Y.W. Triplicated Alpha Globin Loci in Humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77 (1): 518 - 521, 1980.
40. GUANTI, G., LONCOE, A., PIETRAPERTOSA, A., POLIMENO, G. & TANNOIA, N. Alpha-Thalassaemia in Apulia: Biosynthetic Studies. *J Med Genet*, 20: 206 - 209, 1983.

41. HENNI, T., BACHIR, D., TABONE, P., JURDIC, P., GODET, J. & COLONNA, P. Hemoglobin Bart's in Northern Algeria. *Acta Haemat*, 65: 240 - 246, 1981.
42. HENNI, T., MORLÉ, F., LOPEZ, B., COLONNA, P. & GODET, J. Alpha-Thalassemia Haplotypes in the Algerian Population. *Hum Genet*, 75: 272 - 276, 1987.
43. HIGGS, D.R., ALDRIDGE, B.E., LAMB, J., CLEGG, J.B., LOWRIE, Y., MASON, K.P., SERJEANT, B.E. & SERJEANT, G.R. The Interaction of Alpha-Thalassemia and Homozygous Sickle-Cell Disease. *New England J Med*, 306 (24): 1441 - 1446, 1982.
44. HIGGS, D.R., HILL, A.V.S., BOWDEN, D.K., WEATHERALL, D.J. & CLEGG, J.B. Independent Events between the Duplicated Human Alpha-Globin-Genes. Implications for their Concerted Evolution. *Nucleic Acids Res*, 12: 6965 - 6977, 1984.
45. HIGGS, D.R., HILL, A.V.S., NICHOLLS, R., GOODBOURN, S.E.Y., AYYUB, H., TEAL, H., CLEGG, J.B. & WEATHERALL, D.J. Molecular Rearrangements of the Human Alpha-Globin Gene Cluster. *Ann NY Acad Sci*, 445: 45 - 56, 1985.
46. HIGGS, D.R., LAMB, J., ALDRIDGE, B.E., CLEGG, J.B., WEATHERALL, D.J., SERJEANT, B.E. & SERJEANT, G.R. Inadequacy of Hb Bart's as an Indicator of Alpha-Thalassaemia. *Br J Haematol*, 51: 177 - 178, 1982.
47. HIGGS, D.R., PRESSLEY, L., CLEGG, J.B., WEATHERALL, D.J., HIGGS, S., CAREY, P. & SERJEANT, B.R. Detection of Alpha-Thalassaemia in Negro Infants. *Br J Haematol*, 46: 39 - 46, 1980.
48. HIGGS, D.R., PRESSLEY, L., CLEGG, J.B., WEATHERALL, D.J. & SERJEANT, G.R. Alpha-Thalassemia in Black Populations. *Johns Hopkins Med J*, 146 (6): 300 - 310, 1980.
49. HIGGS, D.R., PRESSLEY, L., SERJEANT, G.R., CLEGG, J.B. & WEATHERALL, D.J. The Genetics and Molecular Basis of Alpha-Thalassemia in Association with HbS in Jamaican Negroes. *Br J Haematol*, 47: 43 - 56, 1981.
50. HIGGS, D.R., VICKERS, M.A., WILKIE, A.D.M., PRETORIUS, I.M., JARMAN, A.P. & WEATHERALL, D.J. A Review of the Molecular Genetics of the Human Alpha-Globin Gene Cluster. *Blood*, 73 (5): 1081 - 1104, 1989.

51. HILL, A.V.S., BOWDEN, D.K., TRENT, R.J., HIGGS, D.R., OPPENHEIMER, S.J., THEIN, S.L., HICKLESON, K.N.P., WEATHERALL, D.J. & CLEGG, J.B. Melanesians and Polynesians Share a Unique Alpha-Thalassaemia Mutation. *Am J Hum Genet*, 37: 571 - 580, 1985.
52. HILL, A.V.S. & WAINSCOAT, J.S. The Evolution of the Alpha- and Beta-Globin Gene in Human Populations. *Hum Genet*, 74: 16 - 23, 1986.
53. HUNDRIESER, J., LAIG, M., YONGVANIT, P., SRIBOONLUE, P., SANGUANSEMSRI, T., KUHNAU, W., PAPE, M. & FLATZ, G. Study of Alpha-Thalassaemia in Northeastern Thailand at the DNA Level. *Hum Hered*, 40: 85 - 88, 1990.
54. IFEDIBA, T.C., STERN, A., IBRAHIM, A. & RIEDER, R.F. *Plasmodium falciparum* In Vitro: Diminished Growth in Hemoglobin H Disease Erythrocytes. *Blood*, 65 (2): 452- 455, 1985.
55. JACKSON, I.J. & WILLIAMSON, R. Annotation-Mapping of the Human Globin Genes. *Br J Haematol*, 46: 341 - 349, 1980.
56. JERI, C.A., ROJAS, D.M. & CASTILLO, A.J. Enfermedad por Hemoglobina H. Estudio de Dos Familias Peruanas. *Sangre (Barc)*, 21: 67 - 76, 1976.
57. JOHNSON, C.S., CONSTANTINE, T. & BEUTLER, E. Alpha-Thalassaemia. Prevalence and Hematologic Findings in American Blacks. *Arch Intern Med*, 142: 1280 - 1283, 1982.
58. KAN, Y.W. Molecular Pathology of Alpha-Thalassaemia. *Ann NY Acad Sci*, 445: 28 - 36, 1985.
59. KAN, Y.W., DOZY, A.M., VARMUS, H.E., TAYLOR, J.M., HOLLAND, J.F. & LIE-INJO, L.E. Deletion of Alpha-Globin Genes in Haemoglobin H Disease Demonstrates Multiple Alpha-Globin Structural Loci. *Nature*, 255: 255 - 256, 1975.
60. KANAVAKIS, E., METAXOTOU-MAVROMATI, A., KATTAMIS, C. & WAINSCOAT, J.S. The Triplicated Alpha-Gene Locus and Beta Thalassaemia. *Br J Haematol*, 54: 201 - 207, 1983.

61. KANAVAKIS, E., TZOTZOS, S., LIAPAKI, A., METAXOTOU-MAVROMATI, A. & KATTAMIS, C. Frequency of Alpha-Thalassaemia in Greece. *Am J Hematol*, 22: 225 - 232, 1986.
62. KANAVAKIS, E., WAINSCOT, J.S., WOOD, W.G., WEATHERALL, D.J., CAO, A., FURBETTA, M., GALANELLO, R., GEORGIU, D. & SOPHOCLEOUS, T. The Interaction of Alpha-Thalassaemia with Heterozygous Beta-Thalassaemia. *Br J Haematol*, 52: 465 - 473, 1982.
63. KUTLAR, F., GONZALEZ-REDONDO, J.M., KUTLAR, A., GURGEY, A., ALTAY, C., EFREMOV, G.D., KLEMAN, K. & HUISMAN, T.H.J. The Levels of ζ , γ , and δ Chains in Patients with Hb H Disease. *Hum Genet*, 82: 179 - 186, 1989.
64. LEHMANN, H. Different Types of Alpha-Thalassaemia and Significance of Haemoglobin Bart's in Neonates. *Lancet*, July, 1970.
65. LEHMANN, H. & CARRELL, R.W. Nomenclature of the Alpha Thalassaemias. *Lancet*, i (8376): 552 - 553, 1984.
66. LIEBHABER, S.A. Alpha Thalassaemia. *Hemoglobin*, 13 (7&8): 685 - 731, 1989.
67. LIEBHABER, S.A., COLEMAN, M.B., ADAMS III, J.G., CASH, F.E. & STEINBERG, M.H. Molecular Basis for Nondeletion Alpha-Thalassaemia in American Blacks. *J Clin Invest*, 80: 154 - 159, 1987.
68. LIE-INJO, L.E., HERRERA, A.R., LEO, R.V., HASSAN, K. & LOPEZ, C.G. Gene Mapping of Malaysian Alpha Thalassaemias with Alpha and Zeta Globin Gene Probes. *Am J Hematol*, 18: 289 - 296, 1985.
69. LIE-INJO, L.E., SOLAI, A., HERRERA, A.R., NICOLAISEN, L., KAN, Y.W., WAN, W.P. & HASAN, K. Hb Bart's Level in Cord Blood and Deletions of Alpha-Globin Genes. *Blood*, 59 (2): 370 - 376, 1982.
70. LUZZI, G.A., TORII, M., AIKAWA, M. & PASVOL, G. Unrestricted Growth of *Plasmodium falciparum* in Microcytic Erythrocytes in Iron Deficiency and Thalassaemia. *Br J Haematol*, 74: 519 - 524, 1990.
71. MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. & SAMBROOK, J. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

72. MARTINEZ, G. & COLOMBO, B. Alpha-Thalassaemia in Cuba. *Acta Haemat*, 55: 36 - 39, 1976.
73. MATHEW, C.G.P., ROUSSEAU, J., REES, J.S. & HARLEY, E.H. The Molecular Basis of Alpha Thalassaemia in a South African Population. *Br J Haematol*, 55: 103 - 111, 1983.
74. MEARS, J.G., LACHMAN, H.M., LABIE, D. & NAGEL, R.L. Alpha Thalassaemia is Related to Prolonged Survival in Sickle Cell Anemia. *Blood*, 62 (2): 286 - 290, 1983.
75. MELIS, M.A., PIRASTU, M., GALANELLO, R., FURBETTA, M., TERESA, T. & CAO, A. Phenotypic Effect of Heterozygous Alpha and Beta^o-Thalassaemia Interaction. *Blood*, 62 (1): 226 - 229, 1983.
76. MELLON, P., PARKER, V., GLUZMAN, Y. & MANIATIS, T. Identification of DNA Sequences Required for Transcription of the Human α_1 -Globin Gene in a New SV 40 Host-Vector System. *Cell*, 27: 279 - 288, 1981.
77. MICHELSON, A.M. & ORKIN, S.H. Boundaries of Gene Conversion within the Duplicated Human Alpha-Globin Genes. *J Biol Chem*, 258 (24): 15245 - 15254, 1983.
78. NA-NAKORN, S. & WASI, P. Alpha-Thalassaemia in Northern Thailand. *Am J Hum Genet*, 22: 645 - 651, 1970.
79. NHONOLI, A.M., KOJWALILE, J.M., MMARI, P.W. & SHEMAGHODA, Y. Haemoglobin Bart's in Newborn Tanzanians. *Acta Haemat*, 61:114 - 119, 1979.
80. NOVELLETTO, A., HAFEZ, M., DI RIENZO, A., FELICETTI, L., DDEIDDA, G., EL MORSI, Z., AL-TONBARY, Y., EL-ZINY, M., ABD-EL-GELIL, N. & TERRENATO, L. Frequency and Molecular Types of Deletional Alpha-Thalassaemia in Egypt. *Hum Genet*, 81: 211 - 213, 1989.
81. OHENE-FREMPONG, K., RAPPAPORT, E., ATWATER, J., SCHWARTZ, E. & SURREY, S. Alpha-Gene Deletions in Black Newborn Infants with Hb Bart's. *Blood*, 56 (5): 931 - 933, 1980.
82. OJWANG, P.J., OGADA, T., BERIS, P., HATTORI, Y., LANCIOS, K.D., KUTLAR, A., KUTLAR, F. & HUISMAN, T.H.J. Haplotypes and Alpha-Globin Gene Analyses in Sickle Cell Anaemia Patients from Kenya. *Br J Haematol*, 65: 211 - 215, 1987.

83. OLIVIERI, N.F., CHANG, L.B., POON, A.O., MICHELSON, A.M. & ORKIN, S.H. An Alpha-Globin Gene Initiation Codon Mutation in a Black Family with HbH Disease. *Blood*, 70 (3): 729 - 732, 1987.
84. OTTOLENGHI, S., LANYON, W.G., PAUL, J., WILLIAMSON, R., WEATHERALL, D.J., CLEGG, J.B., PRITCHARD, J., POOTRAKUL, S. & BOON, W.H. Gene Deletion as the Cause of Alpha-Thalassaemia. *Nature*, 251: 389 - 392, 1974.
85. OZSOYLU, S. & MALIK, S.A. Incidence of Alpha-Thalassaemia in Turkey. *Turk J Pediatr*, 24 (4): 235 - 244, 1982.
86. PAGNIER, J., DUNDA-BELKHODJA, O., ZOHOUN, I., TEYSSIER, J., BAYA, H., JAEGER, G., NAGEL, R.L. & LABIE, D. Alpha-Thalassaemia among Sickle Cell Anemia Patients in Various African Populations. *Hum Genet*, 68: 318 - 319, 1984.
87. PEDROLLO, E., HUTZ, M.H., SALZANO, F.M. & TIMM, A.R. Detecção de Hemoglobina Bart e Frequência de Talassemia Alfa em uma População de Neonatos de Porto Alegre. *Ciência e Cultura*, 40 (supl): 810, 1988.
88. PEMBREY, M.E., MACWADE, P. & WEATHERALL, D.J. Reliable Routine Estimation of Small Amounts of Foetal Haemoglobin by Alkali Denaturation. *J Clin Path*, 25: 738 - 740, 1972.
89. PEMBREY, M.E., WEATHERALL, D.J., CLEGG, J.B., BUNCH, C. & PERRINE, R.F. Haemoglobin Bart's in Saudi Arabia. *Br J Haematol*, 29: 221 - 225, 1975.
90. PILISZEK, T.S. Hb Bart's and its Significance in the South African Negro. *Acta haemat*, 61: 33 - 38, 1979.
91. RAMALHO, A.S. *As Hemoglobinopatias Hereditárias. Um Problema de Saúde Pública no Brasil*. Ribeirão Preto, Revista Brasileira de Genética, 1986.
92. RINGELHANN, B. Haemoglobin Bart's and Alpha-Thalassaemia in African Children. *Acta haemat*, 65: 142 - 143, 1981.
93. ROUSSEAU, J., MATHEW, C.G.P., REES, J.S., DU TOIT, E., BOTHA, M.C. & HARLEY, E.H. Incidence of Hb Bart's and Alpha-Thalassaemia Genotypes in a South African Population. *Acta haemat*, 73: 159 - 162, 1985.

94. SAENZ, G.F., ELIZONDO, J., ARROYO, G., JIMÉNEZ, J. & MONTERO, G. Síndromes Drepanocíticos en Costa Rica. VI. Síndrome de Heterocigosis Doble S/Alpha Talasemia. *Sangre (Barc)*, 24 (2):205 - 210, 1979.
95. SAENZ, G.F., JIMÉNEZ, E. & MORA, L. Enfermedad por Hemoglobina H en Costa Rica. *Sangre (Barc)*, 24 (3): 333 - 339, 1979.
96. SAMPIETRO, M., CAZZOLA, M., CAPPELLINI, M.D. & FIORELLI, G. The Triplicated Alpha-Gene Locus and Heterozygous Beta Thalassaemia: A Case of Thalassaemia Intermedia. *Br J Haematol*, 55: 709 - 710, 1983.
97. SANCAR, G.B., CEDENO, M.M. & RIEDER, R.F. The Varied Arrangement of the Alpha-Globin Genes in Alpha-Thalassaemia and Hb H Disease in American Blacks. *Johns Hopkins Med J*, 146 (6): 264 - 269, 1980.
98. SCHMAIER, A.H., MAURER, H.M., JOHNSTON, C.L. & SCOTT, R.B. Alpha Thalassaemia Screening in Neonates by Mean Corpuscular Volume and Mean Corpuscular Hemoglobin Determination. *J Pediatr*, 83 (5): 794 - 797, 1973.
99. SERJEANT, B.E., MASON, K.P., KENNY, M.W., STUART, J., HIGGS, D.R., WEATHERALL, D.J., HAYES, R.J. & SERJEANT, G.R. Effect of Alpha Thalassaemia on the Rheology of Homozygous Sickle Cell Disease. *Br J Haematol*, 55 (3): 479 - 486, 1983.
100. SONATI, M.F. & COSTA, F.F. Hemoglobin Bart's in a Brazilian Black Population. *Brazilian J Med Biol Res*, 23: 395 - 396, 1990.
101. SOUTHERN, E.M. Detection of Specific Sequences among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J Mol Biol*, 98: 503 - 517, 1975.
102. STEINBERG, M.H., COLEMAN, M.B., ADAMS III, J.G., HARTMANN, R.C., SABA, H. & ANAGNOU, N.F. A New Gene Deletion in the Alpha-Like Globin Gene Cluster as the Molecular Basis for the Rare Alpha- Thalassaemia-1 ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) in Blacks: MbH Disease in Sickle Cell Trait. *Blood*, 76 (2): 469 - 473, 1986.
103. STEINBERG, M.H., COLEMAN, M.B., ADAMS III, J.G., PLATICA, O., GILLETTE, P. & RIEDER, R.F. The Effects of Alpha-Thalassaemia in Hb SC Disease. *Br J Haematol*, 55: 487 - 492, 1983.

104. STEINBERG, M.H. & EMBURY, S.H. Alpha-Thalassaemia in Blacks: Genetic and Clinical Aspects and Interactions with the Sickle Hemoglobin Gene. *Blood*, 68 (5): 985-990, 1986.
105. STEINBERG, M.H. & HEBBEL, R.P. Clinical Diversity of Sickle Cell Anemia: Genetic and Cellular Modulation of Disease Severity. *Am J Hematol*, 14: 405 - 416, 1983.
106. TAYLOR, J.M., DOZY, A.M., KAN, Y.W., VARMUS, H.E., LIE-INJO, L.E., GANESAN, J. & TODD, D. Genetic Lesion in Homozygous Alpha Thalassaemia (Hydrops Fetalis). *Nature*, 251: 392 - 393, 1974.
107. THEIN, S.L., AL-HAKIM, I. & HOFFBRAND, A.V. Thalassaemia Intermedia: A New Molecular Basis. *Br J Haematol*, 56: 333 - 337, 1984.
108. THEIN, S.L., WALLACE, R.B., PRESSLEY, L., CLEGG, J.B., WEATHERALL, D.J. & HIGGS, D.R. The Polyadenylation Site Mutation in the Alpha-Globin Gene Cluster. *Blood*, 71 (2): 313 - 319, 1988.
109. TONDO, C.V. & SALZANO, F.M. Abnormal Hemoglobins in a Brazilian Negro Population. *Am J Hum Genet*, 14: 401-409, 1962.
110. TSINTSOF, A.S., HERTZBERG, M.S., PRIOR, J.F., MICKELSON, K.N.F. & TRENT, R.J. Alpha-Globin Gene Markers Identify Genetic Differences between Australian Aborigines and Melanesians. *Am J Hum Genet*, 46: 138 - 143, 1990.
111. VAN BAELEN, H., VANDEPITTE, J., CORNU, G. & EECKLES, R. Routine Detection of Sickle-Cell Anaemia and Haemoglobin Bart's in Congolese Neonates. *Trop Geogr Med*, 21: 412 - 426, 1969.
112. VELATI, C., SAMPIETRO, M., SCIARIADA, L., ALLIEVI, E., MOSCONI, L., CAPPELLINI, M.D. & FIORELLI, G. Neonatal Screening for Hb Bart's in Italian Subjects of Heterogeneous Regional Origin Born in Lombardy. *Haematologica (Pavia)*, 68 (1): 20 - 29, 1983.
113. VILLEGAS, A., GUTIERREZ, A.P., MEDIAVILLA, J.D. & ESPINOS, D. Observaciones de Alfa-Talasemia y de Hemoglobina H en Españoles. *Sangre (Barc)*, 24 (6): 1088 - 1102, 1979.

114. VYAS, P., HIGGS, D.R., WEATHERALL, D.J., DUNN, D., SERJEANT, B.E. & SERJEANT, G.R. The Interaction of Alpha Thalassaemia and Sickle Cell-Beta^o Thalassaemia. *Br J Haematol*, 70: 449-454, 1988.
115. WATSON, J.D., HOPKINS, N.H., ROBERTS, J.W., STEITZ, J.A., WEINER, A.M. *Molecular Biology of The Gene*. 4th edn. California, Massachusetts, Ontario, United Kingdom, Amsterdam, Sydney, Singapore, Tokyo, Madrid, Bogota, Santiago, San Juan, The Benjamin / Cummings Publishing Company Inc., 1988.
116. WEATHERALL, D.J. Abnormal Haemoglobins in the Neonatal Period and their Relationship to Thalassaemia. *Br J Haematol*, 9: 265 - 277, 1963.
117. WEATHERALL, D.J. Biochemical Phenotypes of Thalassaemia in the American Negro Population. *Ann NY Acad Sci*, 118: 450 - 462, 1964.
118. WEATHERALL, D.J. & CLEGG, J.G. *The Thalassaemias Syndromes*. 3rd edn. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1981.
119. WHO WORKING GROUP Hereditary Anaemias: Genetics Basis, Clinical Features, Diagnosis and Treatment. *Bull WHO*, 60 (5): 643 - 660, 1982.
120. WINICHAGOON, P., THONGLAIRUAM, V., FUCHARDEN, S., TANPHAICHITO, V.S. & WASI, P. Alpha-Thalassaemia in Thailand. *Hemoglobin*, 12 (5&6): 485 - 498, 1988.
121. WONG, S.C., ALI, M.A.M. & BOYADJIAN, S.E. Sickle Cell Traits in Canada. Trimodal Distribution of HbS as a Result of Interaction with Alpha-Thalassaemia Gene. *Acta haemat*, 65 (3): 157 - 163, 1981.
122. WU, G.Y., WANG, S.W., ZHANG, J.W. & WANG, L.M. The Incidence of Alpha-Thalassaemia in South China. *Hemoglobin*, 12 (5&6): 529 - 532, 1988.
123. YUTHAVONG, Y., BUTTHER, P., BUNYARATVEJ, A., FUCHARDEN, S. & KHUSMITH, S. Impaired Parasite Growth and Increased Susceptibility to Phagocytosis of *Plasmodium falciparum* Infected Alpha-Thalassaemia or Hemoglobin Constant Spring Red Blood Cells. *Am J Clin Pathol*, 89 (4): 521 - 525, 1988.

124. ZAGO, M.A. & COSTA, F.F. Hereditary Haemoglobin Disorders in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79: 385 - 388, 1985.
125. ZAGO, M.A., COSTA, F.F. & BOTTURA, C. Teste de Solubilidade Quantitativo Modificado em Hemolisados Normais e em Variantes da Hemoglobina. *Rev Paul Med*, 100 (3): 15 - 17, 1982.
126. ZAGO, M.A., COSTA, F.F. & BOTTURA, C. Hemoglobin H Disease in Three Brazilian Families. *Rev Brasil Genet*, VII (1): 137 - 147, 1984.
127. ZAGO, M.A., COSTA, F.F., TONE, L.G. & BOTTURA, C. Hereditary Hemoglobin Disorders in a Brazilian Population. *Hum Hered*, 33: 125 - 129, 1983.
128. ZAGO, M.A. & PAÇÓ-LARSON, M.L. Hemoglobin H Disease Caused by Two Gene Deletions. *Brazilian J Med Biol Res*, 22: 675 - 681, 1989.
129. ZENG, Y.T., HUANG, S.Z. & CHEN, M.J. The Types and Distribution of Alpha-Thalassemia-2 in China. *Hemoglobin*, 12 (5&6): 455 - 458, 1988.
130. ZHAO, W., ZHANG, J., WANG, N.S. & DENG, P. The Relationship between Hb Bart's Levels in Cord Blood and the Deletions of Alpha-Globin Genes. *Hemoglobin*, 12 (5&6): 519 - 527, 1988.

APÊNDICE 1 - SOLUÇÕES, TAMPÕES, CORANTE

I. ANÁLISE DAS HEMOGLOBINAS

Tampão Tris-EDTA-Borato, pH 8,6

Tri (hidroximetil) - amino metano.....	10,2g
EDTA.....	0,6g
Ácido bórico.....	3,2g
Água destilada.....	1000ml

Tampão Citrato, pH 5,8

Citrato de tri-sódio di-hidratado.....	15,0g
Água destilada.....	1000ml

Tampão Fosfato, pH 6,5

Fosfato monobásico de potássio.....	3,11g
Fosfato bibásico de sódio.....	1,66g
Água destilada.....	1000ml

Solução de Benzidina

Benzidina.....	1,0g
Nitroprussiato de sódio.....	1,0g
Ácido acético glacial.....	100ml
Água destilada.....	300ml

II - ANÁLISE DE DNA

1. Extração

Tampão de Lise das Hemácias

Cloreto de sódio.....	10mM
Cloreto de magnésio.....	5mM
Tris-HCl pH 7,5.....	10mM

Tampão de Lise de Glóbulos Brancos

Uréia.....	7M
Cloreto de sódio.....	0,3M
EDTA.....	10mM
Tris-HCl pH 7,5.....	10mM

Mistura Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico

Fenol bidestilado.....	250ml
Clorofórmio.....	240ml
Álcool isoamílico.....	10ml

O fenol é inicialmente saturado com 125 ml de solvente aquoso (Tris-HCl, pH 8,0, 50mM, EDTA 10mM, cloreto de sódio 10mM, 8-hidroxiquinolina, 200mg), e em seguida misturado ao clorofórmio e álcool.

3. Eletroforese

Tampão TEB, pH 8,0

Trizma Base (Sigma T-1509).....	10,8g/l
Ácido bórico.....	5,5g/l
EDTA 0,2M.....	10,0 ml

4. Transferência

Solução Alcalina (Desnaturante)

Hidróxido de sódio.....	0,5N
Cloreto de sódio.....	1,5M

Solução Neutralizante

Cloreto de sódio.....	3,0M
Tris-HCl pH 7,5.....	0,5M

Solução de Transferência (20 x SSC)

Cloreto de sódio.....	3,0M
Citrato de sódio.....	0,3M

5. Hibridização

a. Preparo da Sonda

Meio de Cultura LB

Triptona.....	1%
Extrato de Levedura.....	0,5%
Cloreto de sódio.....	1%

O pH é ajustado em 7,5 com ácido clorídrico concentrado.

Lise Alcalina - Solução I

Glicose.....	50mM
Tris-HCl pH 8,0.....	25mM
EDTA.....	10mM

Lise Alcalina - Solução II

Hidróxido de sódio.....	0,2N
SDS.....	1%

c. Híbridização e Autoradiografia

Solução de Pré-Híbridização

Formamida.....	50%
SDS.....	5%
SSC.....	5x
Tris-HCl pH 7,5.....	0,02M
Solução de Denhardt's*.....	1%

*Solução de Denhardt's

Polivinil-pirrolidona (PVP-360).....	2g/100ml
Ficoll 400.....	2g/100ml
BSA (Sigma A-4378).....	2g/100ml

Solução de Híbridização

Formamida.....	50%
SDS.....	1%
SSC.....	5x
Tris-HCl pH 7,5.....	0,02M
Solução de Denhardt's.....	1%
Dextran-sulfato.....	5%
DNA de esperma de salmão.....	100 mg/ml

Tampão de Lavagem 1

SSC..... 2x

SDS..... 0,1%

Tampão de Lavagem 2

SSC..... 0,1x

SDS..... 0,1%

APÊNDICE 2

TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS HEMATOLÓGICAS DOS INDIVÍDUOS COM ALTERAÇÃO DO GENÓTIPO ALFA

GENÓTIPO	CASO	PADRÃO DE Hb	HM ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	HbA ₂ (%)	HbF (%)	HbS (%)	RET (%)
- α / $\alpha\alpha$	MHA	A ₂ ,A	5,48	15,6	45	82	28,5	2,3	0,4	-	0,6
- α / $\alpha\alpha$	AADP	A ₂ ,A	4,69	13,5	40	85	29,0	2,3	0,4	-	0,7
- α / $\alpha\alpha$	TJM	A ₂ ,A	4,66	13,5	40	86	29,0	2,2	0,4	-	0,4
- α / $\alpha\alpha$	HTS	A ₂ ,A	5,41	13,9	43	80	25,5	3,1	0,9	-	0,9
- α / $\alpha\alpha$	CRS	A ₂ ,A	5,45	15,3	44	84	29,4	2,5	0,7	-	0,6
- α / $\alpha\alpha$	EPC	A ₂ ,A	6,08	16,1	46	80	27,7	2,2	0,6	-	0,8
- α / $\alpha\alpha$	OJB	A ₂ ,A	5,70	16,2	50	89	28,8	2,8	0,9	-	0,5
- α / $\alpha\alpha$	ABM	A ₂ ,A	5,50	14,6	45	83	26,9	2,5	0,7	-	1,0
- α / $\alpha\alpha$	MPN	A ₂ ,S,A	6,30	17,2	50	83	28,6	2,7	0,3	26,5	1,1
- α / $\alpha\alpha$	JRF	A ₂ ,S,A	5,91	14,3	44	78	27,7	3,4	0,6	28,0	1,0
- α / $-\alpha$	JES	A ₂ ,A	6,71	14,5	53	82	22,7	2,2	0,9	-	1,2
$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	MMVR	A ₂ ,A	4,03	11,9	36	90	29,4	2,8	1,0	-	0,8
$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	EJA	A ₂ ,A	5,83	18,0	54	94	31,2	2,6	1,0	-	1,1
$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	GS	A ₂ ,S,A	6,23	15,8	45	76	26,5	1,3	0,7	29,0	1,0

TABELA 6 - COMPARAÇÃO DOS DADOS HEMATOLÓGICOS DE HETEROZIGOTOS DA TALASSEMIA ALFA+ E INDIVÍDUOS NORMAIS

DADOS HEMATOLÓGICOS	HETEROZIGOTOS (n=10)		NORMAIS (n=33)		TESTE t ($\alpha=0,05$)
	média	desvio padrão	média	desvio padrão	
Hm (x $10^6/mm^3$)	5,52	0,53	5,05	0,59	-2,2544 P=0,03
Hb (g/dl)	15,02	1,26	15,04	1,42	0,0327 P=0,97
Ht (%)	44,84	3,50	44,24	4,14	-0,4134 P=0,68
VCM (fl)	83,00	3,23	87,67	5,14	2,7009 P=0,01
HCM (pg)	28,11	1,19	29,82	1,60	3,1173 P=0,01
Hb A ₂ (%)	2,60	0,40	2,64	0,38	0,2604 P=0,80
Hb F (%)	0,59	0,21	0,55	0,26	Z ^(*) 0,805 P=0,21
Ret (%)	0,76	0,24	0,74	0,33	-0,1850 P=0,85

(*) - teste não paramétrico de Wilcoxon