

NADIA MARQUES DA SILVA

*INFLUÊNCIA DA TALASSEMIA α^+ NOS ÍNDICES
HEMATIMÉTRICOS VCM E HCM E NOS PERCENTUAIS
DE HB ANÔMALA EM PORTADORES DA HB C*

CAMPINAS

2001

NADIA MARQUES DA SILVA

***INFLUÊNCIA DA TALASSEMIA α^+ NOS ÍNDICES
HEMATIMÉTRICOS VCM E HCM E NOS PERCENTUAIS
DE HB ANÔMALA EM PORTADORES DA HB C***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA DE FÁTIMA SONATI

CAMPINAS

2001

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Si38i Silva, Nadia Marques da
Influência da talassemia α^+ nos índices hematimétricos UCM e
HCM e nos percentuais de Hb anômala em portadores da Hb C /
Nadia Marques da Silva. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Maria de Fátima Sonati
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hemoglobina. 2. Hemoglobinopatia. 3. Talassemia. I. Maria
de Fátima Sonati. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

Membros:

1. Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves
2. Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa
3. Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 14/12/01

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, que sempre me apoiou e não teve tempo de ver um de seus investimentos concluído e à minha mãe, por acreditar em mim.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati, por orientar este trabalho com paciência e dedicação e acreditar no meu desempenho.

Ao Prof. Dr. Fernando F. Costa, por sua participação na idealização deste projeto.

À Profa. Dra. Marilda S. Gonçalves por suas precisas observações e sugestões.

Aos colegas do laboratório, Elza, Eliane, Lau, Aline, Tânia, Dorival, Cinira e à Simone do Hemocentro, que, de alguma forma, contribuíram para o andamento do trabalho.

À Márcia, por estar presente nos momentos que precisei.

Às amigas Carmen A. C. Aguiar e Sirley por seu profissionalismo e constante apoio.

À Marina, Gisele, Simone Sant'Anna, Ronaldo e Fernando por sua amizade.

À Maira, por ter se arriscado, cedendo um espaço, em seu apartamento, a uma estranha, o que lhe rendeu um lugar de destaque na ala “amigos” e, de brinde, trouxe um Turati, uma Ariane e uma louca do 8º andar (o famoso Danão).

Às “Carmens Silvias”, por tudo que, em conjunto ou avulsas, fizeram por mim.

Ao trio Iara e “Carmens”, que me aceitaram, após algumas provas de anormalidade, no Clube do Café da Quarta.

Às minhas “irmãzinhas” Simone Bordignon, Denise e Daniela por terem sido o meu grande suporte técnico e pessoal. À Denise que, surpreendentemente, enriqueceu meu vocabulário nordestino e me fazia rir, mesmo quando era difícil. À Daniela que, com sua “mineirice”, me mostrava que manter a calma não é uma tarefa tão árdua assim. À Simone que me conhece, muitas vezes, melhor do que eu mesma, e sempre manteve comigo uma sintonia confortável.

À minha família, que soube entender os meus períodos de ausência.

À Andréa da Comissão de Pesquisa-Estatística-FCM-Unicamp.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>ix</i>
ABSTRACT	<i>xi</i>
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1. As Hemoglobinas Humanas.....	14
1.2. Os Genes das Globinas.....	15
1.3. Variantes Estruturais da Hemoglobina.....	16
1.3.1. Hemoglobina C	17
1.4. Síndromes Talassêmicas.....	20
1.4.1. Talassemia alfa.....	20
1.5. Interação da Talassemia α com Variantes de Cadeia β	23
2. CAPÍTULO 1: “Low MCV Values in Heterozygous AC are not Secondary to α-Thalassemia”	26
3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXOS	50

	PÁG.
Figura 1: Representação esquemática da molécula de hemoglobina.....	14
Figura 2: <i>Cluster</i> α (localizado no braço curto do cromossomo 16).....	15
Figura 3: <i>Cluster</i> β (localizado no braço curto do cromossomo 11).....	15
Figura 4: A: esfregação de sangue periférico de homozigoto CC. B: esfregação de sangue periférico de duplo heterozigoto SC.....	18
Figura 5: A: haplótipos β^C de origem Africana. B: haplótipo β^C encontrado na Tailândia.....	19
Figura 6: Subsegmentos homólogos X, Y e Z, contendo os genes α	21
Figura 7: Recombinação entre os segmentos Z.....	22



RESUMO

A microcitose, definida como volume corpuscular médio dos eritrócitos reduzido ($VCM < 82$ fl), é uma alteração hematológica usualmente associada às talassemias, aos distúrbios de metabolismo do ferro e a algumas hemoglobinopatias estruturais, como as Hb E, Hb CC e Hb SC. Nos heterozigotos AC, embora comumente observada, a redução do VCM não tem sido bem explicada, sendo sugerido, por alguns autores, que se deva à coexistência com a talassemia α^+ . Na população negróide brasileira, tanto a Hb C quanto a talassemia α^+ são freqüentes e, portanto, com alta probabilidade de associação. Com o objetivo de avaliar a presença e os efeitos desta interação nos valores de VCM, HCM e nos percentuais de Hb C, a deleção $-\alpha^{3.7}$ (*rightward deletion*) foi investigada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em 149 indivíduos com Hb C (136 AC, 10 SC e 3 CC). Paralelamente, os níveis de Hb F também foram determinados. Vinte e sete indivíduos (18,1%) apresentaram talassemia α^+ : 24 (16,1%) eram heterozigotos $-\alpha/\alpha\alpha$ (21 AC e 3 SC) e 3 (2,0%) eram homozigotos $-\alpha/-\alpha$ (2 AC e 1 SC). Como esperado, as medianas de VCM, HCM e % Hb C foram significativamente mais baixas no grupo dos talassêmicos. As medianas de % Hb F não diferiram estatisticamente entre talassêmicos e os indivíduos que não apresentaram a deleção. A microcitose foi observada em 43 heterozigotos AC (31,6%), mas em 30 deles (22% do total) a deleção $-\alpha^{3.7}$ não foi detectada. Os valores de VCM foram comparados aos percentuais de Hb C e apenas uma fraca correlação foi observada. No presente estudo, a associação com a talassemia α^+ não explicou a redução do VCM em 22% dos indivíduos AC, indicando que essa alteração hematológica pode ser resultante da própria presença da Hb C, embora sua proporção nas hemácias não seja o fator determinante do grau de microcitose.



ABSTRACT

Microcytosis, defined as reduced mean corpuscular volume of erythrocyte (MCV<82 fl), is a hematological alteration usually associated to the thalassemias, to the disorders of iron metabolism and, also, to some structural hemoglobinopathies, as Hb E, Hb CC and Hb SC. In heterozygous AC, although commonly observed, it has not been very well explained, being suggested that it could be due to the coexistence with α^+ -thalassemia. In the Brazilian Black population both, Hb C and α^+ -thalassemia, are very frequent and, therefore, with high probability of association. In order to evaluate the presence and the effects of this interaction in the MCV and MCH values and in the percentages of Hb C, the $-\alpha^{3.7}$ rightward deletion was investigated by polymerase chain reaction (PCR) in 149 individuals with Hb C (136 AC, 10 SC and 3 CC). Hb F levels were also determined. Twenty seven individuals (18,1%) presented α^+ -thalassemia: 24 (16,1%) were heterozygous $-\alpha/\alpha\alpha$ (21 AC and 3 SC) and 3 (2,0%) homozygous $-\alpha/-\alpha$ (2 AC and 1 SC). As expected, the median of MCV, MCH and % Hb C were significantly lower in the thalassemic group. The median of % Hb F were not statistically different between thalassemics and in individuals not carrying the deletion. Microcytosis was observed in 43 heterozygous AC (31,6%); however, 30 of them (22% of the total) did not show the $-\alpha^{3.7}$ rightward deletion. MCV values were compared to the percentages of Hb C and showed only a weak correlation. In the present study, the association with α^+ -thalassemia could not explain the reduction of MCV in 22% of the AC individuals, indicating that it is probably resulting of the presence of Hb C in the cell, itself, and seems not to be dependent on its proportion.



INTRODUÇÃO

1.1. AS HEMOGLOBINAS HUMANAS

As hemoglobinas (Hb) humanas são proteínas tetraméricas, constituídas pela combinação de duas cadeias globínicas do “tipo α ” (α ou ζ) com duas cadeias do “tipo β ” (β , δ , γ ou ϵ). Cada cadeia contém um grupo prostético heme (Fig. 1), que se liga de forma reversível à molécula de O_2 , transportando-a dos pulmões aos tecidos (Bunn & Forget, 1986).

Na fase embrionária, são produzidas as hemoglobinas Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland I ($\zeta_2\gamma_2$). Durante o período fetal, a produção dessas Hbs dá lugar à síntese de Hb F ($\alpha_2\gamma_2$), que, por sua vez, é substituída pelas Hbs A ($\alpha_2\beta_2$) e A₂ ($\alpha_2\delta_2$) no estágio adulto. Após os seis meses de vida, os indivíduos normais apresentam cerca de 95% de Hb A, 2-3% de Hb A₂ e 0-2% de Hb F (Bunn & Forget, 1986; Stamatoyannopoulos e col., 1994).

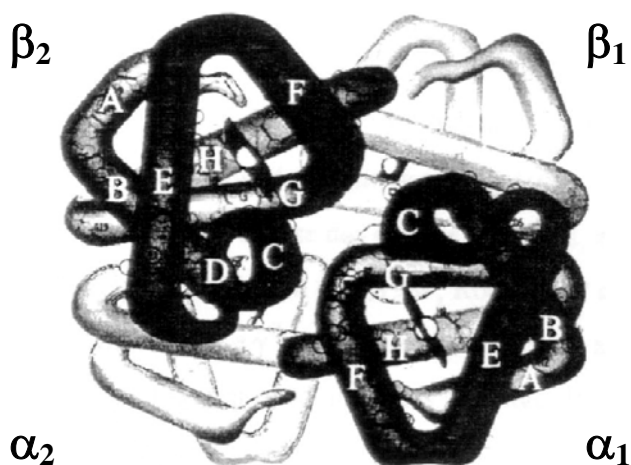


Figura 1: Representação esquemática da molécula de hemoglobina.

1.2. OS GENES DAS GLOBINAS

Os genes responsáveis pela codificação das cadeias globínicas são compactos, com cerca de 1 a 2 Kb de DNA, formados por 3 exons e 2 introns e estão localizados em dois agrupamentos, ou *clusters*, denominados α e β , onde se encontram dispostos na ordem em que são expressos durante o desenvolvimento do indivíduo (Figs. 2 e 3).

O *cluster* α é composto pelo gene embrionário ζ_2 , por 3 pseudogenes ($\psi\zeta_1$, $\psi\alpha_2$ e $\psi\alpha_1$), pelos genes α_2 e α_1 e pelo gene θ_1 , de função ainda indeterminada, e está localizado no braço curto do cromossomo 16 (16p13.3) (Lauer e col., 1980; Higgs e col., 1989).

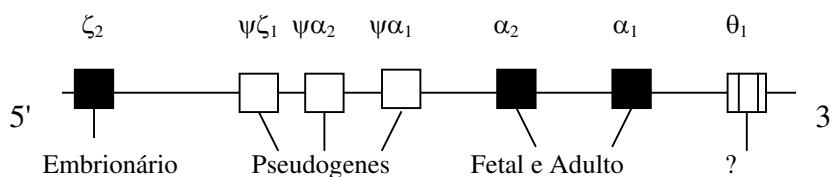


Figura 2: *Cluster* α , localizado no braço curto do cromossomo 16.

O *cluster* β é composto pelo pseudogene β_2 , pelo gene embrionário ϵ , pelos genes γ^G e γ^A , pelo pseudogene β_1 e pelos genes δ e β , e está localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5) (Fritsch e col., 1980).

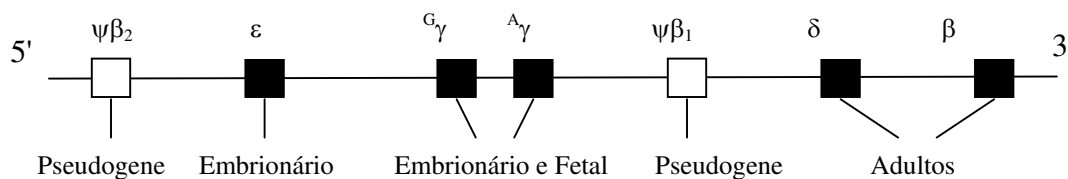


Figura 3: *Cluster* β , localizado no braço curto do cromossomo 11.

Mutações nos genes das globinas podem levar a alterações estruturais, à deficiência parcial ou total no ritmo de síntese das cadeias ou à produção persistente de cadeias γ durante a vida adulta, constituindo, respectivamente, as variantes estruturais da hemoglobina, as talassemias e a Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF) (Bunn & Forget, 1986).

1.3. VARIANTES ESTRUTURAIS DA HEMOGLOBINA HUMANA

Grande parte das variantes estruturais da Hb são decorrentes da substituição de um único aminoácido em uma das cadeias globínicas. Apenas algumas alterações resultam em manifestações clínicas e hematológicas importantes, por modificarem a função, a solubilidade ou a estabilidade da molécula. Em muitas variantes ocorre mudança de carga elétrica, levando a uma mobilidade eletroforética diferente daquela apresentada pela hemoglobina normal. Outras, porém, são eletroforeticamente silenciosas, sendo necessária a utilização de técnicas complementares de identificação (Dacie & Lewis, 1995).

As hemoglobinopatias S ($\alpha_2\beta_2^{6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}}$), C ($\alpha_2\beta_2^{6\text{Glu}\rightarrow\text{Lis}}$), D ($\alpha_2\beta_2^{121\text{Glu}\rightarrow\text{Gln}}$) e E ($\alpha_2\beta_2^{26\text{Glu}\rightarrow\text{Lis}}$) são muito comuns e atingiram prevalências elevadas em determinadas populações, a ponto de serem consideradas polimorfismos genéticos (Orkin & Kazazian, 1984; Williams e col., 1990).

São muitos os mecanismos moleculares responsáveis pela formação de variantes estruturais, porém as mais comuns, como já citado, são causadas por uma simples substituição de nucleotídeo. A identificação de sítios de restrição no *cluster* β tem demonstrado que as mutações estão associadas a padrões de clivagem específicos, denominados haplótipos, permitindo uma maior compreensão sobre sua origem e dispersão, enriquecendo os dados antropológicos, ou auxiliando no diagnóstico de determinadas doenças (Maniatis e col., 1980; Orkin & Kazazian, 1984; Labie & Elion, 1996).

Assim, o polimorfismo encontrado no sítio Hpa I da região 3' do gene da globina β foi utilizado inicialmente no diagnóstico pré-natal da anemia falciforme (SS) (Kan & Dozy, 1978) e sua análise levou às primeiras conclusões sobre a evolução das mutações β^S e β^C nas diferentes populações mundiais (Kan & Dozy, 1980).

A mutação β^S tem ampla distribuição geográfica e originou-se independentemente em várias partes da África e no leste da Arábia Saudita e Índia (Kan & Dozy, 1980; Pagnier e col., 1984; Kulozik e col., 1986; Trabuchet e col., 1991). Embora seja causada por uma simples substituição de nucleotídeo em homozigose, a anemia falciforme é caracterizada por uma clínica muito variável e, por isso, a análise dos haplótipos tornou-se uma ferramenta útil na elucidação desta variabilidade (Nagel e col., 1985; Powars e col., 1990; Powars & Hiti, 1993). Diferentes seqüências polimórficas ao longo do *cluster* (Labie & Elion, 1996), em desequilíbrio de ligação com os haplótipos, estão relacionadas a variações nos níveis de hemoglobina fetal, que interfere na polimerização da Hb S (Steinberg, 1994) e na expressão da cadeia alterada (Elion e col., 1992).

As Hbs D compreendem um grupo de hemoglobinas com migração eletroforética semelhante à Hb S em pH alcalino, porém a mais comum é a Hb D-Los Angeles ou D-Punjab ($\alpha_2\beta_2^{121\text{Glu}\rightarrow\text{Gln}}$), com freqüência de aproximadamente 3% na região noroeste da Índia (Bunn & Forget, 1986; Williams e col., 1990).

A Hb E é uma variante estrutural com fenótipo talassêmico e freqüência bastante elevada no sudeste da Ásia, de aproximadamente 3% (Bunn & Forget, 1986; Williams e col., 1990).

1.3.1. Hemoglobina C

A Hb C foi a segunda variante estrutural a ser descrita (Itano & Neel, 1950), logo após a Hb S, sendo, depois desta e da Hb E, a terceira mais prevalente no mundo (Bunn & Forget, 1986). É resultante da substituição de ácido glutâmico por lisina na posição 6 da cadeia β , o que confere à molécula uma carga final bastante positiva, levando-a a aderir na membrana celular, com conseqüente perda de potássio e água, aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e formação de eritrócitos mais densos (Bunn & Forget, 1986). Em acetato de celulose, em pH alcalino, apresenta a mesma migração eletroforética da Hb A₂ e de outras variantes estruturais, como, por exemplo, as Hbs E e O Arab, podendo ser confirmada por eletroforese em gel de ágar, em pH ácido (Dacie & Lewis, 1995).

Os heterozigotos AC são assintomáticos, apresentando células levemente desidratadas e mais densas (Nagel e col., 1993). Os percentuais de Hb C representam aproximadamente 30 a 40% do total de hemoglobina e células em alvo podem ser visualizadas no esfregaço sanguíneo (Bunn & Forget, 1986; Williams e col., 1990).

O estado homozigoto CC é caracterizado por uma anemia hemolítica crônica de intensidade discreta. Um grande número de células em alvo é observado (Fig. 4A) e, em decorrência da concentração de hemoglobina e da desidratação mais acentuadas, ocorre formação de agregados e cristais no interior dos eritrócitos, nas formas desoxigenada e oxigenada da hemoglobina, respectivamente (Fabry e col., 1981; Hirsch e col., 1985; Bunn & Forget, 1986).

A Hb S é a variante estrutural mais comumente observada em associação com a Hb C nas populações de origem africana, como é o caso da população brasileira (Zago & Costa, 1985; Sonati e col., 1996). Indivíduos com Doença SC apresentam anemia hemolítica crônica e, como as células CC, as SC são mais desidratadas e com concentração de hemoglobina mais elevada (Ballas & Kocher, 1988; Lawrence e col., 1991), demonstrando características celulares das duas hemoglobinopatias (Williams e col., 1990) (Fig. 4B).

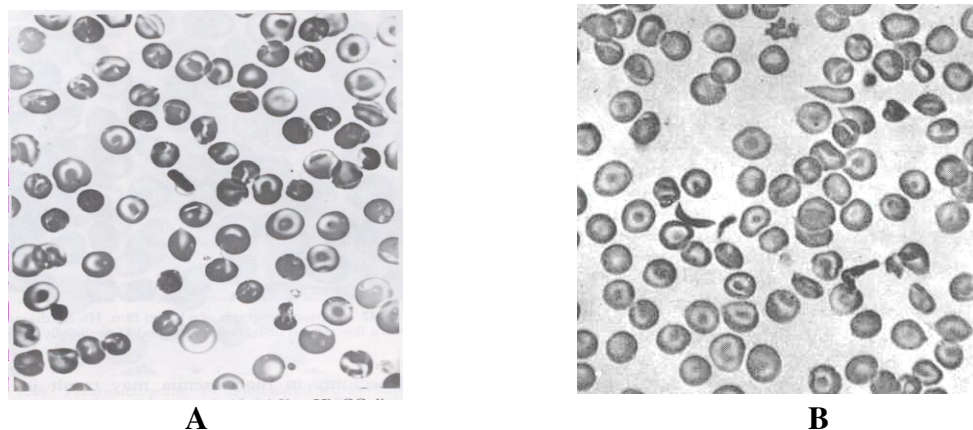


Figura 4: **A:** esfregaço de sangue periférico de homozigoto CC. **B:** esfregaço de sangue periférico de duplo heterozigoto SC, mostrando características das duas hemoglobinopatias.

A investigação dos haplótipos ligados ao alelo β^C tem favorecido a hipótese de uma ocorrência da mutação na região Centro-Oeste da África (Boehm e col., 1985; Trabuchet e col., 1991). Em Ghana e Volta, aproximadamente 25% dos indivíduos são heterozigotos AC (Bunn & Forget, 1986; Williams e col., 1990). Os haplótipos de origem africana foram classificados segundo Boehm e col. como CI, CII e CIII (fig. 5A), sendo o primeiro o mais prevalente e encontrado em todas as populações estudadas (Schroeder e col., 1989; Talacki e col., 1990; Travi e col., 1992; Steinberg e col., 1996; Lee e col., 1998). Embora seja muito menos prevalente que o tipo CI, o haplótipo CII também tem sido encontrado em muitas populações (Schroeder e col., 1989; Talacki e col., 1990; Steinberg e col., 1996; Lee e col., 1998) e, assim como o CIII e outros raros, provavelmente surgiu por evento de recombinação entre os subhaplótipos 5' e 3' (Chakravarti e col., 1984).

Mais recentemente, a caracterização molecular da Hb C na Tailândia tem sugerido a hipótese de uma outra origem da mutação nesta região, associada a um único haplótipo (fig. 5B) (Sanchaisuriya e col., 2001).

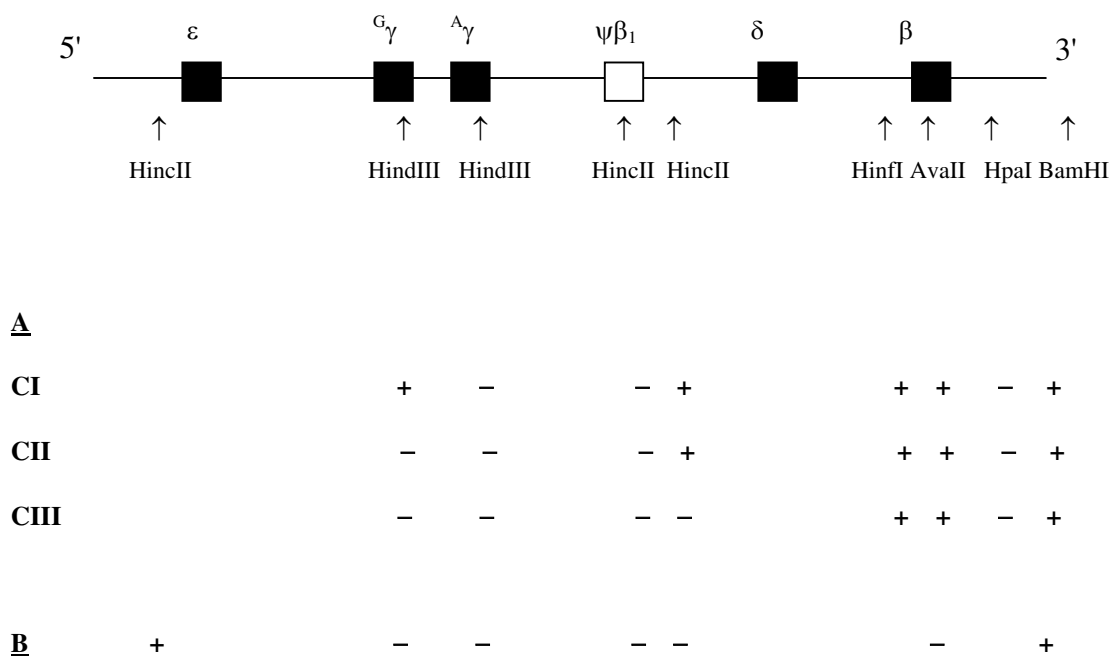


Figura 5: + e - indicam presença e ausência do sítio de restrição. **A:** haplótipos β^C de origem Africana (Boehm e col., 1985). **B:** haplótipo encontrado na Tailândia, indicando uma origem não africana da mutação β^C (Sanchaisuriya e col., 2001).

Os fatores seletivos para a alta incidência da Hb C são desconhecidos (Williams e col., 1990), tendo sido sugerido que sua presença exerça alguma proteção contra a malária severa em determinadas populações, onde a prevalência da Hb S é reduzida (Agarwal e col., 2000).

1.4. SÍNDROMES TALASSÊMICAS

As talassemias são definidas como um grupo heterogêneo de alterações hereditárias, que resultam na síntese deficiente de uma ou mais cadeias globínicas, levando à formação de hemácias hipocrômicas e microcíticas, características destas síndromes. A cadeia (ou cadeias), cuja síntese encontra-se prejudicada, determina o tipo de talassemia (α , β , γ , δ , $\delta\beta$, $\gamma\delta\beta$, $\epsilon\gamma\delta\beta$) (Williams e col., 1990; Stamatoyannopoulos e col., 1994). A supressão parcial ou total de uma das cadeias leva ao acúmulo da cadeia complementar, que se tetrameriza e precipita no interior dos eritrócitos, ocasionando a destruição precoce destas células (Bunn & Forget, 1986).

1.4.1. Talassemia α

As talassemias α são caracterizadas pela síntese reduzida de globina α , resultando em excesso de cadeias do tipo β , que se associam e formam tetrâmeros, produzindo a Hb Bart's (γ_4), no período fetal, e a Hb H (β_4), após o nascimento (Weatherall & Clegg, 1981).

Os genes α são duplicados, totalizando 4 ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) em cada célula diplóide de indivíduos normais (Orkin, 1978). As talassemias são classificadas em α^+ ($-\alpha$) e α^0 ($--$), conforme o número de genes comprometidos no cromossomo, levando, respectivamente, à redução parcial ou total da síntese de cadeias α (Higgs, 1993; Kattamis e col., 1996). Os genes estão dispostos em unidades duplicadas de 4Kb, altamente homólogas e mantidas através da evolução por conversão gênica e eventos de *crossing over* (Lauer e col., 1980; Michelson & Orkin, 1983; Higgs e col., 1984). Estas regiões são divididas em subsegmentos homólogos (X, Y e Z) por elementos não homólogos (I, II e III) (fig 6).

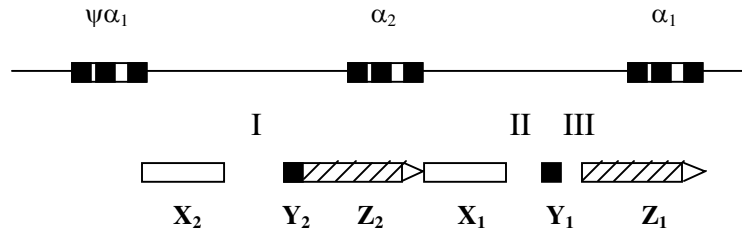


Figura 6: Os subsegmentos homólogos X, Y e Z, separados pelos elementos não homólogos I, II e III.

Os mecanismos moleculares que resultam em deficiência de síntese das cadeias α são diversos, compreendendo formas delecionais e não-delecionais. Estas últimas são menos freqüentes e causadas por mutações de ponto ou pequenas deleções ou inserções, que interferem no processamento, na tradução do mRNA ou na estabilidade da variante transcrita (Higgs, 1993; Stamatoyannopoulos e col., 1994).

As formas delecionais podem envolver a remoção de um dos genes ($-\alpha$) ou de ambos ($--$) no cromossomo ou ainda a região controladora do locus (LCR), onde os dois genes permanecem intactos, mas não são expressos (Higgs, 1993). Eventos de recombinação não homóloga são responsáveis pelas deleções que causam a talassemia α^0 , sendo as mais comuns as deleções $--^{MED}$ e $-(\alpha)^{20.5}$, freqüentes na região Mediterrânea e $--^{SEA}$, comum no Sudeste Asiático (Kattamis e col., 1996). Nas primeiras, fragmentos de 18 Kb (regiões 5' do $\psi\zeta_1$ e 5' do gene θ_1) e 20,5 Kb (região 5' do $\psi\zeta_1$ e porção 5' do gene α_1 , que fica inativo) são removidos, respectivamente. Na última, a deleção envolve aproximadamente 20 Kb de DNA, desde o $\psi\zeta_2$ até o gene θ_1 .

O alto grau de homologia entre as unidades duplicadas facilitam eventos de *crossing over* desigual durante a meiose, resultando na deleção de um gene em um dos cromossomos ($-\alpha$) e na presença de genes triplicados no outro ($\alpha\alpha\alpha$) (Higgs e col., 1984). Assim, a causa mais comum de talassemia α^+ é a deleção de 3.7 Kb de DNA (deleção $-\alpha^{3.7}$), referida como *rightward deletion* (Embury e col., 1980), que pode ocorrer em três

diferentes posições, gerando vários genes híbridos α_{2-1} (Higgs e col., 1984), podendo os haplótipos (I, II e III) ser diferenciados por análise de restrição com a enzima Apa I (Dodé e col., 1993; Baysal & Huisman, 1994) (fig 7).

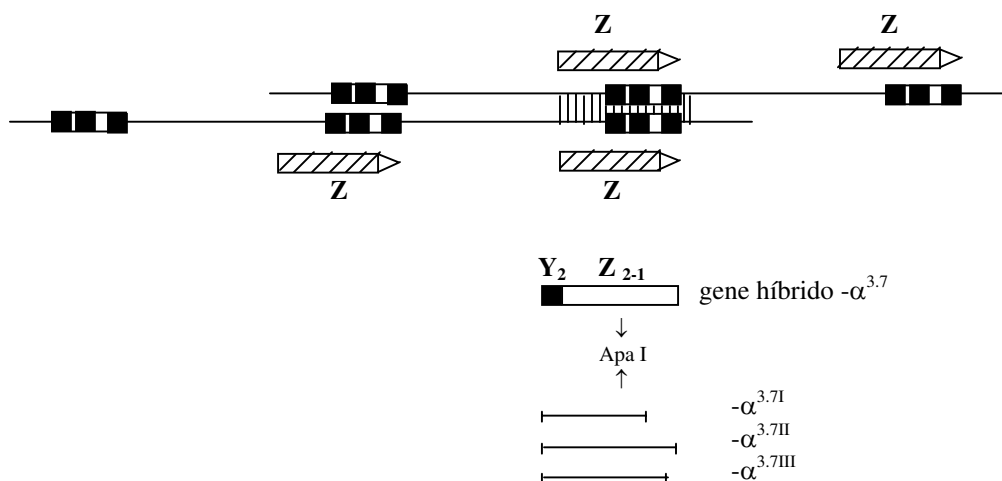


Figura 7: Recombinação entre os segmentos Z e os três haplótipos que podem ser formados, definidos por meio do sítio de restrição da enzima ApaI.

A deleção $-\alpha^{3.7}$ tem distribuição mundial, com frequências elevadas no Mediterrâneo, na África e na Ásia (Embury e col., 1980), sugerindo um efeito protetor contra a malária (Flint e col., 1986). Em algumas populações, como na Melanésia e Polinésia, essa forma de talassemia chega a atingir prevalências tão elevadas quanto 80%.

A deleção de 4.2 Kb de DNA (*leftward deletion*) é a segunda causa mais freqüente de talassemia α^+ e resulta da recombinação entre os segmentos homólogos X, tendo prevalência elevada no Sudeste Asiático (Embury e col., 1980; Higgs e col., 1989; Kattamis e col., 1996).

Clinicamente, as talassemias α são classificadas em traço talassêmico (α^+ e α^0), Doença da Hb H e Síndrome da Hidropsia Fetal por Hb Bart's.

Os indivíduos heterozigotos ($-\alpha/\alpha\alpha$) são assintomáticos, podendo apresentar de 1 a 3% de Hb Bart's ao nascimento e nenhuma alteração hematológica na vida adulta, ou apenas microcitose e hipocromia muito discretas. Os estados homozigoto ($-\alpha/-\alpha$) ou heterozigoto ($--/\alpha\alpha$) também não determinam manifestações clínicas, sendo detectadas de 5 a 10% de Hb Bart's ao nascimento e eritrócitos com aspecto microcítico e hipocrômico na vida adulta. Na Doença da Hb H ($--/-\alpha$), os indivíduos apresentam anemia hemolítica crônica de intensidade moderada, com níveis de 25 a 30% de Hb Bart's ao nascimento e de 5 a 30% de Hb H na vida adulta e hemácias microcíticas e hipocrômicas. A Síndrome da Hidropsia Fetal por Hb Bart's leva à morte fetal ou neonatal, com aproximadamente 100% de Hb Bart's (Bunn & Forget, 1986; Williams e col., 1990).

1.5. INTERAÇÃO DA TALASSEMIA α COM VARIANTES DE CADEIA β

Em muitas populações em que a talassemia α é comum, há também uma alta frequência de variantes estruturais da hemoglobina (Pagnier e col., 1984; Steinberg, 1991; Stamatoyannopoulos e col., 1994; Segbena e col., 1998), produzindo diferentes interações, com fenótipos clínicos e hematológicos variáveis.

A talassemia α^+ , assim como os níveis de Hb F, é um conhecido modulador da expressão clínica e hematológica na Anemia Falciforme (SS) e na Doença SC (Powars e col., 1990), mas clinicamente há controvérsias quanto aos limites desta modulação. Alguns autores sugerem uma melhora no curso clínico da doença e uma sobrevida prolongada (Honig e col., 1976; Mears e col., 1983; Rodgers e col., 1986; Mukherjee e col., 1997), enquanto outros não encontraram esta relação (Montalembert e col., 1993; Steinberg e col., 1983; Steinberg e col., 1996; Lee e col., 1998; Mouélé e col., 2000). Contudo, de uma forma geral, há consenso de que a talassemia α influencia os parâmetros hematológicos, reduzindo a intensidade de hemólise nesses pacientes (Deceular e col., 1983; Lee e col., 1998).

Nos heterozigotos de variantes carregadas positivamente como as Hbs S, C, D e E, a proporção da hemoglobina variante é sempre menor que 50% do total de hemoglobina e decresce gradualmente à medida que a quantidade de cadeias α disponíveis torna-se limitada (Wong e col., 1981; El-Hazmi e col., 1986; Liebhaber e col., 1988; Giordano e col., 1997; Huisman, 1997).

Na população brasileira, altamente miscigenada, as alterações de hemoglobina mais importantes são as Hbs S e C, e as talassemias α (α^+ , deleção $-\alpha^{3.7}$) e β , com prevalências médias de, aproximadamente, 8%, 1% e 23,5% na população negróide e 1% na população caucasóide, respectivamente, refletindo a forte influência das populações africana e europeia no país (Zago and Costa, 1985; Sonati e col., 1991; Sonati e col., 1996). Assim, tanto a Hb C quanto a talassemia α^+ são freqüentes e, portanto, com alta probabilidade de associação.

A microcitose, definida como volume corpuscular médio das hemácias (VCM) inferior a 82fl, é uma alteração hematológica relacionada à deficiência de síntese de Hb, nas talassemias e nos distúrbios do metabolismo do ferro (Williams e col., 1990), podendo ocorrer ainda na presença de variantes estruturais com fenótipo talassêmico, como as Hbs E e Constant Spring, por exemplo, ou em homozigotos CC ou duplos heterozigotos SC (Williams e col., 1990; Stamatoyannopoulos e col., 1994; Ballas & Kocher, 1988). Em heterozigotos AC, apesar de freqüentemente observada, a redução do VCM não tem sido bem explicada, sendo algumas vezes atribuída à coexistência com a talassemia α^+ (Steinberg, 1975; Walker e col., 1979).

Como na população brasileira essas duas hemoglobinopatias encontram-se com prevalências elevadas, o principal objetivo do presente trabalho foi avaliar a presença e os efeitos da associação nos índices VCM e HCM (hemoglobina corpuscular média das hemácias), bem como no percentual de Hb anômala formada. Para isso, a deleção $-\alpha^{3.7}$ foi investigada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), segundo Dodé e col., 1993, em 149 portadores da Hb C (136 AC, 10 SC e 3 CC). Paralelamente, os índices de Hb F dos portadores foram também determinados e comparados.

Como um objetivo secundário, os dois sítios polimórficos do cluster β que diferenciam os principais haplótipos relacionados à mutação β^C (Hind III no IVS 2 do gene γ e Hinc II na região 3' do $\psi\beta$) foram analisados e as variáveis VCM, HCM, % Hb C e % Hb F comparadas entre os diferentes genótipos encontrados. Como a casuística deve ser ampliada para que os resultados sejam confiáveis, estes encontram-se apresentados no anexo 2 deste volume de tese.



CAPÍTULO I

LOW MCV VALUES IN HETEROZYGOTES FOR HEMOGLOBIN C ARE NOT SECONDARY TO α -THALASSEMIA

N.M. Silva¹, C.S. Soledade¹, F.F. Costa², M.F. Sonati¹

¹Department of Clinical Pathology

²Department of Clinical Medicine

School of Medical Sciences

State University of Campinas - UNICAMP

CP 6111 – CEP 13083-970 – Campinas (SP), Brazil

Microcytosis, defined as mean corpuscular volume of the red blood cells (MCV) lower than 82fl, is a hematological alteration resulting from impaired hemoglobin synthesis in thalassemias and in disorders of iron metabolism (1). It also occurs in some structural hemoglobinopathies, as Hb E, Hb CC and Hb SC (1,2). In Hb C, the replacement $\beta 6$ Glu→Lys results in a final positive charge which causes the adherence of this abnormal Hb to the red cell membrane, leading to the loss of K^+ and water and increasing the mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and the red cell density (3,4). In homozygous CC and doubly heterozygous SC there is the reduction of erythrocyte diameter, intracellular crystallization of hemoglobin and formation of microspherocytes (5-7). In heterozygous AC, the MVC below normal range, not rarely observed, has been sometimes suggested be due to the coexistence with α^+ -thalassemia (8,9), which reaches high frequencies in endemic malaria areas where Hb C is also common (1,3,10).

In the Brazilian Black population, Hb C and α^+ thalassemia ($-\alpha^{3.7}$ rightward deletion) are found in frequencies around 1% and 23%, respectively (11-13). In order to evaluate the presence and the effects of this interaction on MCV values, the $-\alpha^{3.7}$ deletion was investigated in 149 adult individuals with Hb C (136 AC, 10 SC and 3 CC), referred to the UNICAMP University Hospital, in Campinas, State of São Paulo, Southeast region of Brazil. Mean corpuscular hemoglobin (MCH) and the percentages of Hb C were also determined. To exclude iron deficiency, all the heterozygous AC had normal Hb levels ($Hb \geq 14$ g/dl for men and ≥ 12 g/dl for women); 4 SC and 1 CC patients with Hb between 10,2 g/dl and 12,7 g/dl had normal serum ferritin levels.

Red blood cell indices (MCV and MCH) were electronically determined (Cell Dyn 3500, Abbot) and Hb analyses were carried out by electrophoresis on cellulose acetate, at pH 8.9 and on agar gel, at pH 6.0 (14). Hb C percentages were determined by elution of the corresponding band after cellulose acetate electrophoresis (14). Serum ferritin levels were determined for the cases with total Hb below normal range by automated chemiluminescent immunoenzymatic method (Kit Immulite – Diagnostic Products Co., USA). Alpha-thalassemia was investigated by polymerase chain reaction (PCR) according to Dodé et al, 1993 (15). Mann-Whitney nonparametric test was utilized for statistical comparisons. Correlation between MCV and % Hb C was checked by Pearson correlation coefficient (16).

Among the 149 samples analyzed, 27 (18,1%) presented the $-\alpha^{3.7}$ deletion: 24 (16,1%) were heterozygous $-\alpha/\alpha\alpha$ (21 AC and 3 SC) and 3 (2,0%) were homozygous $-\alpha/-\alpha$ (2 AC and 1 SC). Table I summarizes the deletion frequencies and the hematological values obtained. As expected, the means of MCV, MCH and % Hb C were significantly lower in the thalassemic group ($-\alpha/\alpha\alpha$ and $-\alpha/-\alpha$) than in the group with normal α -genotype ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$). Among the 136 heterozygous AC, MCV reduction (< 82 fl) was observed in 43 individuals (31,6%); however, 30 of them (22% of the total) did not present the $-\alpha^{3.7}$ deletion. Only 4 of these non-thalassemic cases presented MCH below the normal range (27-32 pg), in these, β^+ -thalassemia could not be excluded as it was not possible to measure Hb A₂ using the electrophoretic method. In order to check if MCV reduction was dependent on the Hb C concentration, MCV values were compared to the % Hb C and showed no

correlation (Pearson's Correlation Coefficient; $p=0.45970$) (figure 1). Among the α -thalassemic AC, 10 heterozygotes had normal MCV values. Four out of 10 SC patients had the $-\alpha^{3.7}$ deletion; the mean of their MCV values was significantly lower than the 6 non α -thalassemics ($p=0.019$), while the MCH values and the Hb C percentage means did not statistically differ. Total Hb was higher in the α -thalassemic group ($12,8\pm1,5$) than in the normal α -genotype ($10,9\pm0,7$). The $-\alpha^{3.7}$ deletion was not found in the CC patients.

In the present study, the prevalence of the $-\alpha^{3.7}$ deletion (18,1%) was slightly lower than in the general African descent population of the same Brazilian region (23%) (12,13), but the difference was not statistically significant ($p=0.3238$). Thirty of the 136 heterozygous AC (22%) showed normal α -genotype with MCV values below the normal range; 26 (19%) had concomitant normal MCH values. In the same previous study mentioned above (13), the MCV values found in 30 AA African descents individuals with $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ genotype ranged from 82.6fl to 92.8fl (87.7 ± 5.1), being therefore higher than the values of the non thalassemic AC group found here (78.8-91.4 fl, mean= $85,1\pm6,3$). These results suggest that the reduction of the MCV in AC individuals is due to the presence of Hb C in the erythrocyte. Microcytosis appears to be intensified by the association α -thalassemia-Hb C. Among the 6 individuals SC and the 3 individuals CC, without α -thalassemia, only one out of each group presented microcytosis.

Although less intense than in the cells CC and SC, potassium efflux, cell dehydration and increased cellular density also seem to occur in AC cells (17) and may be responsible the observed reduction of MCV, irrespective of the number of the α -genes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Ms. Daniela M. Ribeiro and Denise F. Duarte and Mrs. Simone B. Jorge, from the Clinical Pathology Department, and Ms. Aline C. Prevedel and Simone C. Sene, from the UNICAMP Hematology and Hemotherapy Center, for their assistance, Dr. Carmen S. P. Lima for referring the SC patients, and Ms. Andrea F. Semolini and the Statistics Committee/FCM/UNICAMP for the statistical analyses. We also thank CNPq and CAPES/BRAZIL, for the financial support.

TABLE 1
Means and Standard Deviations for the Hematological Parameters MCV, MCH and % Hb C

	AC			SC			CC		
	113 $\alpha\alpha/\alpha\alpha$	21 $-\alpha/\alpha\alpha$	2 $-\alpha/-\alpha$	6 $\alpha\alpha/\alpha\alpha$	3 $-\alpha/\alpha\alpha$	1 $-\alpha/-\alpha$	3 $\alpha\alpha/\alpha\alpha$		
MCV (fl) p*=0.0001	85.1 $\pm$ 6.31	81.0 $\pm$ 5.76	71.1 $\pm$ 4.1	89.5 $\pm$ 8.49	77.7 $\pm$ 4.77	61.6	83.0 $\pm$ 15.2		
MCH (pg) p*=0.0001	28.7 $\pm$ 2.22	26.9 $\pm$ 1.98	22.9 $\pm$ 1.2	28.9 $\pm$ 3.1	26.8 $\pm$ 2.05	20.1	27.3 $\pm$ 1.95		
Hb C (%) p**=0.0001	38.3 $\pm$ 2.28	34.1 $\pm$ 2.19	26.8 $\pm$ 0.56	38.0 $\pm$ 1.9	38.4 $\pm$ 4.97	32.0	98.6 $\pm$ 0.25		

*p-values were obtained from comparison between the 2 groups: thalassemics ($-\alpha/\alpha\alpha$ and $-\alpha/-\alpha$) and normal $\alpha\alpha/\alpha\alpha$. Mann Whitney Non Parametric Test.

**p-value excluding CC individuals

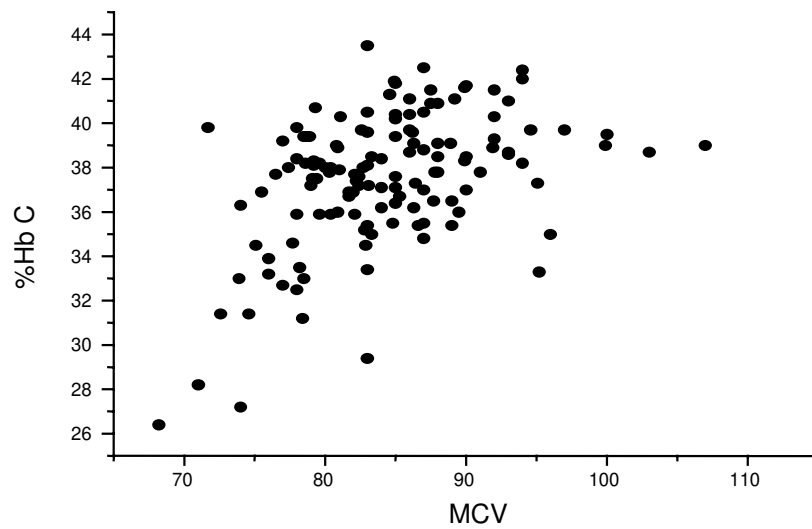


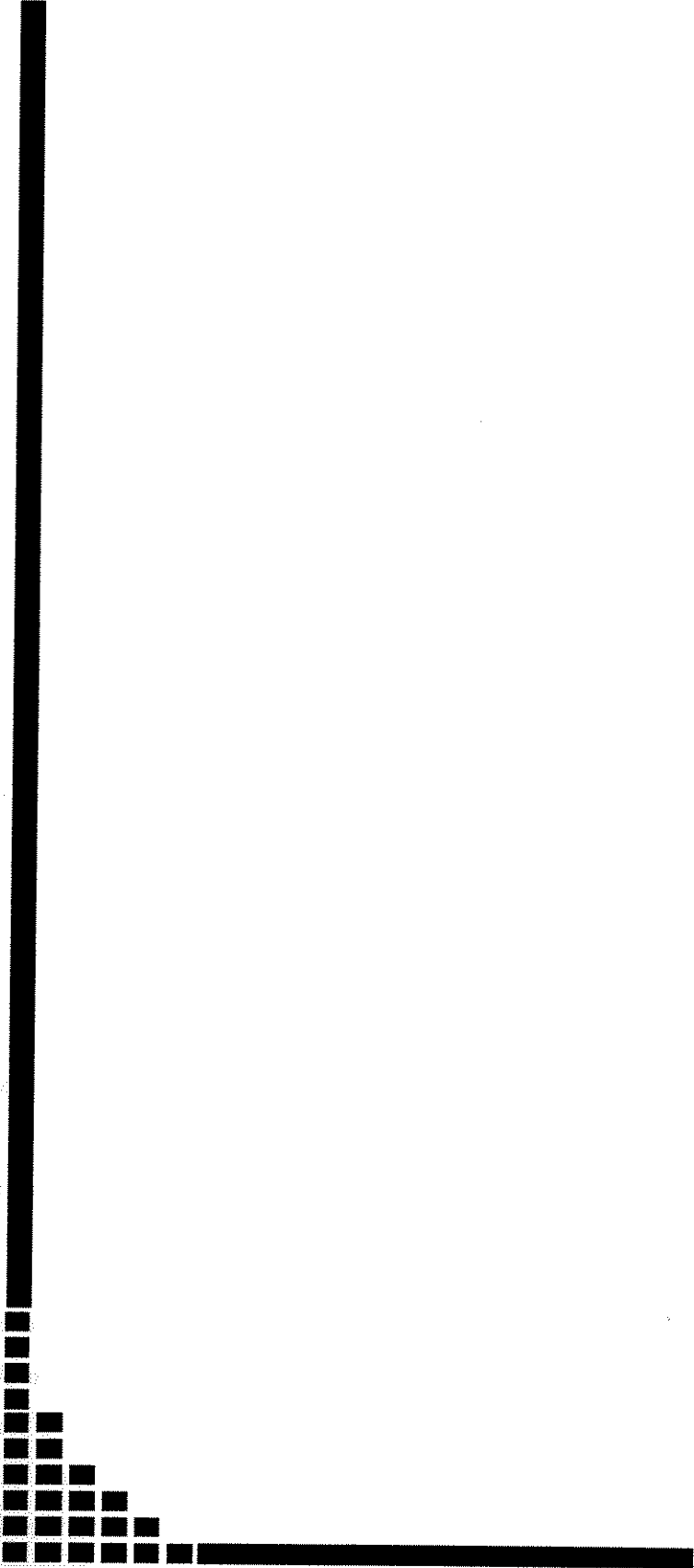
FIGURE 1

Correlation between MCV and %Hb C in the heterozygous AC group, determined by Pearson Correlation Coefficient ($p = 0.45970$, $n = 134$).

REFERENCES

1. Williams, W.J.; Beutler, E.; Erlev, A.J.; Lichtman, M.A. *Hematology*, 6th ed.; Mc Graw Hill Book Company, New York, 2001.
2. Ballas, S.K. and Kocher, W. Erythrocytes in Hb SC Disease Are Microcytic and Hyperchromic. *Am J Hematol* **1988**, 28 (1), 37-39.
3. Stamatoyannopoulos, G.; Nienhis, A.W.; Majerus, P.W. *The Molecular Basis of Blood Disease*, 2nd ed.; WB Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, 1994.
4. Bunn, H.F. and Forget, B.G. *Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects*, 1st ed.; WB Saunders, Philadelphia, 1986.
5. Fabry, M.E.; Kaul, D.K.; Raventos, C.; Baez, S.; Rieder, R.; Nagel, R.L. Some Aspects of the Pathophysiology of Homozygous Hb CC Erythrocytes. *J Clin Invest* **1981**, 67 (5), 1284-1291.
6. Hirsch, R.E.; Suarez, C.R.; Olson, J.A.; Nagel, R.L. Ligand State of Intraerythrocytic Circulating Hb C Crystals in Homozygote CC Patients. *Blood* **1985**, 66 (4), 775-777.
7. Lawrence, C.; Fabry, M.E.; Nagel, R.L. The Unique Red Cell Heterogeneity of SC Disease: Crystal Formation, Dense Reticulocytes, and Unusual Morphology. *Blood* **1991**, 78 (8), 2104-2112.
8. Steinberg, M.H. Haemoglobin C/ α -Thalassaemia: Haematological and Biosynthetic Studies. *Br J Haematol* **1975**, 30 (3), 337-342.
9. Walker, B.K.; Atwater, J.; Ballas, S.K. Interaction of α -Thalassemia Genes with Each Other and with Hb C in an American Black Family. *Biochem Genet* **1979**, 17 (11-12), 1021-1029.
10. Flint, J.; Hill, A.V.S.; Bowden, D.K.; Oppenheimer, S.J.; Sill, P.R.; Serjeatson, S.W.; Bana-Koiri, J.; Bhatia, K.; Alpers, M.P.; Boyce, A.J.; Weatherall, D.J.; Clegg, J.B. High frequencies of α -thalassemia are the result of natural selection by malaria. *Nature* **1986**, 321 (6072), 744-750.

11. Sonati, M.F.; Kimura, E.M.; Grotto, H.Z.W.; Gervásio, A.S., Costa, F.F. Hereditary Hemoglobinopathies in a Population From Southeast Brazil. *Hemoglobin* **1996**, *20* (2), 175-179.
12. Sonati, M.F.; Farah, S.B.; Ramalho, A.S.; Costa, F.F. High Prevalence of α -Thalassemia in a Black population of Brazil. *Hemoglobin* **1991**, *15* (4), 309-311.
13. Sonati, M.F.; Kimura, E.M.; Costa, F.F. Red Cell Indices and Alpha-Thalassemia. *Brazil J Genetics* **1992**, *15* (3), 687-693.
14. Dacie, J.V. and Lewis, S.M. *Pratical Haematology*, 6th ed; Churchill, Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, New York, 1995.
15. Dodé, C.; Krishnamoorthy, R.; Lamb, J.; Rochette J. Rapid analysis of $-\alpha^{3.7}$ thalassaemia and $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$ triplication by enzymatic amplification analysis. *Br J Haematol* **1993**, *83* (1), 105-111.
16. Conover, W. J. *Practical Nonparametric Statistics*. John Wiley & Sons, New York, 1971.
17. Nagel, R.L.; Lin, M.J.; Witkowska, H.E., Fabry, M.E.; Bestak, M.; Hirsch, R.E. Compound Heterozygosity for Hemoglobin and Korle-Bu: Moderate Microcytic Hemolytic Anemia and Acceleration of Crystal Formation. *Blood* **1993**, *82* (6), 1907-1912.



3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

A talassemia α^+ (deleção $-\alpha^{3.7}$) e as variantes estruturais S e C tiveram sua origem na mesma população e atingiram frequências elevadas nas regiões endêmicas de malária (Bunn & Forget, 1986). Assim, não é rara a observação de associação entre estas hemoglobinopatias, tanto nas regiões de origem, quanto nas que receberam influência daquelas populações, como é o caso da população brasileira.

Na Anemia Falciforme e na Doença SC, a talassemia α , assim como a Hb F e os haplótipos β^S , vem sendo estudada como um possível fator modulador da variabilidade de manifestações clínicas apresentadas por estas doenças. Embora haja uma concordância de que, na presença de talassemia α , ocorra menos hemólise e a anemia seja menos severa, clinicamente o resultado parece ser paradoxal, uma vez que, por outro lado, há um aumento da viscosidade sangüínea, levando à maior probabilidade de necrose asséptica de tecidos ósseos, particularmente das cabeças do úmero e do fêmur (Ballas e col., 1989; Steinberg, 1995).

No Brasil, a prevalência da deleção $-\alpha^{3.7}$ em pacientes SS (Costa e col., 1989; Figueiredo e col., 1996) é semelhante àquela encontrada na população negróide normal, doadores de sangue (Sonati e col., 1991). Prevalências maiores foram encontradas entre pacientes SS e SC do que nos grupos controles em diferentes populações africanas (Pagnier e col., 1984; Dodé e col., 1988).

Como a microcitose relacionada à presença da Hb C tem sido melhor explicada nos homozigotos CC e duplos heterozigotos SC, a presença desta alteração hematológica nos indivíduos AC, não raramente observada, geralmente é associada à concomitância com a talassemia α (Steinberg, 1975; Walker e col., 1979).

Com o objetivo de avaliar a prevalência da deleção $-\alpha^{3.7}$ em portadores da Hb C e os efeitos desta interação, 149 indivíduos (136 AC, 10 SC and 3 CC) foram analisados. Quarenta e sete heterozigotos AC foram triados entre doadores de sangue do Hemocentro da UNICAMP e os outros 89 heterozigotos e 1 homozigoto CC foram detectados por meio de um programa sistemático de triagem para hemoglobinopatias, realizado no Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, em

pacientes ambulatoriais não provenientes do Ambulatório de Hematologia. Dois homozigotos CC e os duplo-heterozigotos SC foram selecionados do Ambulatório de Hematologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

Os critérios de seleção incluíram idade superior a 12 anos e níveis normais de Hb (Hb > 14g/dl para homens e 12g/dl para mulheres). Os índices hematimétricos VCM e HCM foram determinados eletronicamente (Cell Dyn 3500, Abbot) e a Hb analisada por eletroforese em acetato de celulose, em pH 8.9, e em gel de ágar, em pH 6.0 (Dacie & Lewis, 1995). Os percentuais de Hb C foram determinados por eluição da banda correspondente após eletroforese em acetato de celulose (Dacie & Lewis, 1995) e a Hb F estimada por desnaturação alcalina (Pembrey e col., 1972). O DNA foi isolado de leucócitos do sangue periférico por extração orgânica com fenol/clorofórmio e a deleção $-\alpha^{3.7}$ investigada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), segundo Dodé e cols (1993).

As frequências encontradas da deleção $-\alpha^{3.7}$ dentro de cada grupo (AC, SC e CC) estão sumarizadas na Tabelas 1, 2 e 3 (anexo 1). Das 149 amostras analisadas, 27 (18,1%) apresentaram a deleção $-\alpha^{3.7}$ (Tabela 4 – anexo 1) : 24 (16,1%) heterozigotos ($-\alpha/\alpha$) e 3 (2,0%) homozigotos ($-\alpha/-\alpha$). Dentro do grupo AC, 21 indivíduos (15,4%) apresentaram a deleção em heterozigose ($-\alpha/\alpha$) e 2 (1,4%) em homozigose ($-\alpha/-\alpha$). No grupo SC, 3 indivíduos eram heterozigotos ($-\alpha/\alpha$) e 1 era homozigoto ($-\alpha/-\alpha$). Aqui, a prevalência de 40%, maior do que a observada na população normal e em pacientes SS da mesma região, deve refletir o número pequeno de casos analisados, sendo necessária a ampliação da amostragem para que os resultados sejam confiáveis. A deleção $-\alpha^{3.7}$ não foi encontrada entre os 3 homozigotos CC.

As comparações das variáveis VCM, HCM, %Hb C e %Hb F entre o grupo de talassêmicos ($-\alpha/\alpha$ e $-\alpha/-\alpha$) e o de não portadores da deleção $-\alpha^{3.7}$ foram realizadas por meio de teste não paramétrico (Mann-Whitney) e estão demonstradas nas Tabelas 5-15 (anexo 1). Como esperado, as medianas de VCM, HCM e dos percentuais de Hb C foram significativamente menores entre os talassêmicos α do que entre os indivíduos que não apresentaram a deleção. Em heterozigotos AC, os percentuais de Hb anômala formada, em concordância com outros estudos (Steinberg, 1975; Liebhaber e col., 1988; Giordano e col.,

1997), decrescem de acordo com a quantidade de genes α presentes, em decorrência da competição acirrada entre as cadeias β normais e as alteradas pelas cadeias α disponíveis.

A Curva ROC (Receiver Operator Characteristic Curve) revelou uma grande sobreposição dos valores individuais de VCM e HCM entre talassêmicos e “não talassêmicos” (Figuras 1A e 1B para o grupo total e Figuras 2A e 2B para os indivíduos AC – anexo 1), demonstrando, mais uma vez (Sonati e col., 1992, Borges e col., 2001), que estes índices hematimétricos não são bons indicadores da talassemia α e da Hb C. Entretanto, pode-se observar, através das curvas, que a área de intersecção entre os valores de VCM de talassêmicos e “não talassêmicos” é maior do que a obtida para a HCM.

Como demonstrado em outros estudos, com pacientes SS (Figueiredo e col., 1996) e SC (Lee e col., 1998), nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada nos níveis de Hb F entre talassêmicos e não portadores da deleção, tanto na amostragem total, quanto dentro de cada grupo (AC e SC).

A prevalência da deleção $-\alpha^{3.7}$ encontrada no grupo AC (16,9%) não diferiu significativamente daquela encontrada previamente na população negróide normal, de doadores de sangue (Sonati e col., 1991) ($p=0.3238$) (Tabela 16). Valores de VCM abaixo de 82fl foram observados em 43 (31,6%) indivíduos e em 30 deles (22% do total de AC) a deleção $-\alpha^{3.7}$ não estava presente. Destes, 4 tinham, concomitantemente, a HCM abaixo da faixa de normalidade (27-32pg). Nestes casos, a talassemia β^+ não pôde ser excluída, em função da impossibilidade de dosagem da Hb A₂ por meio do método eletroforético (Dacie & Lewis, 1995) e de análise familiar, bem como uma outra forma de talassemia α , mais rara e não investigada. A comparação dos valores de VCM com os percentuais de Hb C revelou uma fraca correlação entre estas variáveis (coeficiente de Pearson, $p=0.4697$) (Fig. 2 do anexo 1).

Nos indivíduos SC, apenas as medianas dos valores de VCM dos 4 indivíduos talassêmicos foram significativamente menores do que nos 6 não talassêmicos ($p=0.019$) e somente um, destes últimos, apresentou valores de VCM e HCM abaixo da faixa normal (sexo feminino, Hb de 11,0g/dl, dosagem de ferritina sérica não disponível). Os níveis de Hb foram maiores no grupo com talassemia ($12,8 \pm 1,5$) do que no grupo sem deleção ($10,9 \pm 0,7$), sugerindo que a presença da talassemia α reduz o grau de hemólise.

Dos 3 homozigotos CC, todos sem talassemia α , um indivíduo apresentou microcitose e hipocromia.

A Hb C é menos solúvel que a Hb A e, pela carga final positiva, liga-se preferencialmente à superfície interna da membrana celular, levando à perda de potássio e à desidratação celular observada nas células de portadores desta hemoglobina. Conseqüentemente, a concentração de hemoglobina intracelular é elevada e as células tornam-se mais densas (Bunn & Forget, 1986; Williams e col., 1990). O aumento do CHCM leva à formação de cristais, na forma oxigenada, e de agregados, na forma desoxigenada da hemoglobina, observados nas células CC (Fabry e col., 1981; Hirsch e col., 1985) e SC (Lawrence e col., 1991). Tem sido demonstrado que alguns resíduos de aminoácidos presentes em diferentes hemoglobinas apresentam efeitos de inibição ou aceleração na formação dos cristais (Nagel e col., 1993; Hirsch e col., 1997). Assim, a cristalização da Hb C ocorre preferencialmente em células com baixas concentrações de Hb F (Hirsch e col., 1985; Hirsch e col., 1988) e a Hb S acelera o processo (Lin e col., 1989).

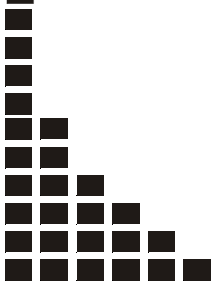
O baço parece exercer alguma função na formação dos microesferócitos característicos da hemoglobinopatia C, mas os processos de redução no tamanho e aumento da densidade celular acontecem precocemente no desenvolvimento dos eritrócitos CC e SC, uma vez que estão presentes em indivíduos esplenectomizados, e que os reticulócitos são consideravelmente mais densos do que aqueles de indivíduos normais (Fabry e col., 1981; Lawrence e col., 1991).

Estudos sobre a associação da Hb C com variantes estruturais que também inibem ou aceleram a cristalização sugerem que a presença de cristais parece ser indispensável para que ocorra hemólise, mas não é necessária para a geração de microcitose e aumento da densidade celular (Nagel e col., 1993; Hirsch e col., 1997).

Embora seja menos intenso que nas células CC e SC, o efluxo de potássio, a desidratação celular e a densidade aumentada também ocorrem nas células AC (Bunn & Forget, 1986, Nagel e col., 1993, Fabry e col., 2000). Estes mecanismos poderiam explicar a redução do VCM, independente do número de genes α presentes.

Em estudo prévio, com 30 indivíduos negróides normais (AA, com genótipo $\alpha\alpha/\alpha\alpha$), a média dos valores de VCM foi de 87.7 fl, com desvio padrão de 5.1 (Sonati e col., 1992), sendo, portanto, maior do que no grupo AC “não talassêmico” aqui analisado, que foi de 85.1 fl, com desvio padrão de 6.3. Outro grupo AA (n=10), de heterozigotos da deleção $-\alpha^{3.7}$, também analisado no trabalho acima citado, apresentou uma média de VCM levemente maior do que a média apresentada pelos indivíduos AC com genótipo $-\alpha/\alpha\alpha$ (83.8 ± 3.2 e $81,0 \pm 5,7$, respectivamente). A associação talassemia α -Hb C, como esperado, parece intensificar a redução do VCM.

Os resultados obtidos no presente trabalho não confirmam a hipótese de que a redução de VCM observada com frequência em heterozigotos AC se deva a uma interação maior com a talassemia α , mas sugerem que este processo é provavelmente resultante da própria presença da Hb C nos eritrócitos e é intensificado pela associação com a talassemia α , o que ocorreu em 9,5% dos casos aqui estudados. A fraca correlação observada entre os valores de VCM e os percentuais de Hb C sugerem ainda que estes não são determinantes do grau de microcitose dos portadores e que outros fatores devem interferir no processo de redução do VCM.



***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- Agarwal, A., Guindo, A., Cissoko, Y., Taylor, J.G., Coulibaly, D., Koné, A., Kayentao, K., Djimde, A., Plowe, C.V., Doumbo, O., Wellems, T.E. and Diallo, D. (2000). Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S. **Blood** **96**: 2358-2363.
- Ballas, S.K. and Kocher, W. (1988). Erythrocytes in Hb SC Disease are Microcytic and Hyperchromic. **Am J Hematol** **28**: 37-39.
- Ballas, S.K., Talacki, C.A., Rao, V.M. and Steiner, R.M. (1989). The Prevalence of Necrosis in Sickle Cell Anemia: Correlation with α -Thalassemia. **Hemoglobin** **13**: 649-655.
- Baysal, E. and Huisman, T.H.J. (1994). Detection of Common Deletional α -Thalassemia-2 Determinants by PCR. **Am J Hematol** **46**: 208-213.
- Boehm, C.D., Dowling, C.E., Antonarakis, S.E., Honig, G.R. and Kazazian, H.H. (1985). Evidence supporting a single origin of the β^C -globin gene in blacks. **Am J Hum Genet** **37**: 771-777.
- Borges, E., Wenning, M.R.S.C., Kimura, E.M., Gervásio, A.S., Costa, F.F. and Sonati, M.F. (2001). High prevalence of α -thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** **34**: 759-762.
- Bunn, H.F. & Forget, B.G. (1986). **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. Philadelphia, W. B. Saunders Company.
- Chakravarti, A., Buetow, K., Antonarakis, S.E., Waber, P.G., Boehm, C.D. and Kazazian, H. H. (1984). Nonuniform Recombination within the Human β -Globin Gene Cluster. **Am J Hum Genet** **36**: 1239-1258.
- Costa, F.F., Tavella, M.H. and Zago, M.A. (1989). Deletion Type α -Thalassemia Among Brazilian Patients With Sickle Cell Anemia. **Rev Brasil Genet (Brazil J Genetics)** **12**: 605-611.

- Dacie, J.V. & Lewis, S.M. (1995). **Practical Haematology**. 8th ed. Churchill, Livingstone.
- Deceular, K., Higgs, D.R., Weatherall, D.J., Hayes, R.J. and Serjeant, G.R. (1983). α -Thalassaemia reduces the haemolytic rate in homozygous sickle-cell disease. **N Engl J Med** **309**: 189-193.
- Dodé, C., Berth, A., Rochette, J., Girot, R. and Labie, D. (1988). Analysis of crossover type in the $-\alpha^{3.7}$ haplotype among sickle cell anemia patients from various parts of Africa. **Hum Genet** **78**: 193-195.
- Dodé, C., Krishnamoorthy, R., Lamb, J. and Rochette, J. (1993). Rapid analysis of $-\alpha^{3.7}$ thalassemia and $\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$ triplication by enzymatic amplification analysis. **Br J Haematol** **83**: 105-111.
- El-Hazmi, M.A.F. (1986). Studies on Sickle Cell Heterozygotes In Saudi Arabia – Interaction with α -Thalassaemia. **Acta haemat** **75**: 100-104.
- Elion, J., Berg, P.E., Lapoumèroulie, C., Trabuchet, G., Mittelman, M., Krishnamoorthy, R., Schechter, A.N. and Labie D. (1992). DNA Sequence Variation in a Negative Control with the Phenotypic Expression of the β^S Mutation. **Blood** **79**: 787-792.
- Embury, S.H., Miller, J.A., Dozy, A.M., Kan, Y.W., Chan, V. and Todd, D. (1980). Two Different Molecular Organizations Accounts for the Single α Thalassemia-2 Genotype. **J Clin Invest** **66**: 1319-1325.
- Fabry, M.E., Kaul, D.K., Raventos, C., Baez, S., Rieder, R. and Nagel R.L. (1981). Some Aspects of the Pathophysiology of Homozygous Hb CC Erythrocytes. **J Clin Invest** **67**: 1284-1291.
- Fabry, M.E., Romero, J.R., Suzuka, S.M., Gilman, J.G., Feeling-Taylor, A., Odunusi, E., Factor, S.M., Bouhassira, E.E., Lawrence, C. and Nagel, R.L. (2000). Hemoglobin C in Transgenic Mice: Effect of Hb C Expression from Founders to Full Mouse Globin Knockouts. **Blood Cells Mol Dis** **26**: 331-347

- Figueiredo, M.S., Kerbaui, J., Gonçalves, V.R., Arruda, V.R., Saad, S.T.O., Sonati, M.F., Stoming, T. and Costa, F.F. (1996). Effect of α -Thalassemia and β -Globin Gene Cluster Haplotypes on the Hematological and Clinical Features of Sickle-Cell Anemia in Brazil. **Am J Hematol** **53**: 72-76.
- 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. and Clegg, J.B. (1986). High frequencies of α -thalassaemia are the result of natural selection by malaria. **Nature** **321**: 744-750.
- Fritsch, E.F., Lawn, R.M. and Maniats, T. (1980). Molecular Cloning and Characterization of the Human β -Like Globin Gene Cluster. **Cell** **19**: 959-972.
- Giordano, P.C., Hartveld, C.L., Michielis, J.J., Terpstra, W., Batelaan, D., van Delft, P., Plug, R.J., van der Wielen, M.J.R., Losekoot, M. and Bernini, L.F. (1997). Atypical HbH disease in a Surinamese patient resulting from a combination of the -SEA and - $\alpha^{3.7}$ deletions with HbC heterozygosity. **Br J Haematol** **96**: 801-805.
- Higgs, D.R., Hill, A.V.S., Bowden, D.K., Weatherall, D.J. and Clegg, J.B. (1984). Independent recombination events between the duplicated human α -globin genes; implications for their concerted evolution. **Nucleic Acids Res** **12**: 6965-6977.
- Higgs, D.R., Vickers, M.A., Wilkie A.O. M., Pretorius, I.-M., Jarman, A.P. and Weatherall D.J. (1989). A Review of the Molecular Genetics of the Human α - Globin Gene Cluster. **Blood** **73**: 1081-1104.
- Higgs, D.R. (1993). The haemoglobinopathies. **Baillière's Clinical Haematology** **6**: 117-150.
- Hirsch, R.E., Raventos, C., Olson, J.A. and Nagel, R.L. (1985). Ligand State of Intraerythrocytic Circulating HbC Crystals in Homozygote CC Patients. **Blood** **66**: 775-777.

- Hirsch, R.E., Lin, M.J. and Nagel, R.L. (1988). The Inhibition of Hemoglobin C Crystallization by Hemoglobin F. **J Biol Chem** **263**: 5936-5939.
- Hirsch, R.E., Witkowska, H.E., Shaper, F., Lin, M.J., Balazs, T.C., Bookchin, R.M. and Nagel, R.L. (1997). HbC compound heterozygotes [HbC/Hb Riyadh and HbC/Hb N-Baltimore] with opposing effects upon HbC crystallization. **Br J Haematol** **97**: 259-265.
- Honig, G.R., Gunay, U., Mason, R.G., Vida, L.N. and Christine, F. (1976). Sick Cell Syndromes. I. Hemoglobin SC- α -Thalassemia. **Pediat Res** **10**: 613-620.
- Huisman, T.H.J. (1997). HbE and α -Thalassemia; Variability in the Assembly of β^E Chain Containing Tetramers. **Hemoglobin** **21**: 227-236.
- Itano, H.A. and Neel, J.V. (1950). A new inherited abnormality of human haemoglobin. **Proc Natl Acad (Wash)** **36**: 613-617.
- Kan, Y.W. and Dozy, A.M. (1978). Polymorphism of DNA sequence adjacent to the β -globin structural gene: Relationship to sickle mutation. **Proc Natl Acad Sci USA** **75**: 5631-5635.
- Kan, Y.W. and Dozy, A.M. (1980). Evolution of the Hemoglobin S and C Genes in World Populations. **Science** **209**: 388-391.
- Kattamis, A.C., Camaschella, C., Sivera, P., Surrey, S. and Fortina, P. (1996). Human α -Thalassemia Syndromes: Detection of Molecular Defects. **Am J Hematol** **53**: 81-91.
- Kulozik, A.E., Wainscoat, J.S., Serjeant, G.R., Kar, B.C., Al-Awamy, B., Essan, G.J.F., Falusi, A.G., Haque, S.K., Hilali, A.M., Kate, S., Ranasinghe, A.E.P. and Weatherall, D.J. (1986). Geographical Survey of β^S -Globin Gene Haplotypes: Evidence for an Independent Asian Origin of the Sickle-Cell Mutation. **Am J Hum Genet** **39**: 239-244.
- Labie, D. and Elion, J. (1996). Sequence Polymorphisms of Potential Functional Relevance in the β -Globin Genes Locus. **Hemoglobin** **20**: 85-101.

- Lauer, J., Shen, C.J. and Maniatis, T. (1980). The Chromosomal Arrangement of Human α -Like Globin Genes: Sequences Homology and α -Globin Genes Deletions. **Cell** **20**: 119-130.
- Lawrence, C., Fabry, M.E. and Nagel R.L. (1991). The Unique Red Cell Heterogeneity of SC Disease: Crystal Formation, Dense Reticulocytes, and Unusual Morphology. **Blood** **78**: 2104-2112.
- Lee, K., Préhu, C., Mérault, G., Kéclard, L., Roudot-Thoraval, F., Bachir, D., Wajcman, H., Denis, L. and Galactéros, F. (1998). Genetic and Hematological Studies in a Group of 114 Adult Patients With SC Sickle Cell Disease. **Am J Hematol** **59**: 15-21.
- Liebhaer, S.A., Cash, F.E. and Cornfield, D.B. (1988). Evidence for Posttranslational Control of Hb C Synthesis in an Individual With Hb C Trait and α -Thalassemia. **Blood** **71**: 502-504.
- Lin, M.J., Nagel, R.L. and Hirsch, R.E. (1989). Acceleration of Hemoglobin C Crystallization by Hemoglobin S. **Blood** **74**: 1823-1825.
- Maniatis, T., Fritsch E.F., Lauer J. and Lawn R.M. (1980). The Molecular Genetics of Human Hemoglobins. **Ann Rev Genet** **14**: 145-178.
- Mears, J.G., Lachman, H.M., Labie, D. and Nagel, R. (1983). Alpha-Thalassemia Is Related to Prolonged Survival in Sickle Cell Anemia. **Blood** **62**: 286-290.
- Michelson, A. and Orkin, S. H. (1983). Boundaries of Gene Conversion within the Duplicated Human α -Globin Genes. Concerted Evolution by Segmental Recombination. **J Biol Chem** **258**: 15245-15254.
- Montalembert, M., Maier-Redelsperger, M., Girot, R., Belloy, M., Vilmer, E., Ducrocq, R., Guidal, C. and Elion, J. (1993). Beta-globin gene cluster haplotype and alpha-thalassemia do not correlate with the acute clinical manifestations of sickle cell disease in children. **Blood** **82**: 2595-2596.

- Mouélé, R., Pambou, O., Feingold, J. and Galactéros, F. (2000). α -Thalassemia in Bantu Population from Congo-Brazzaville: Its Interaction with Sick Cell Anemia. **Hum Hered** **50**: 118-125.
- Mukherjee, M.B., Lu, C.Y., Ducrocq, R., Gangakhedkar, R.R., Colah, R.B., Kadam, M.D., Mohanty, D., Nagel, R.L. and Kishnamoorthy, R. (1997). Effect of α -Thalassemia on Sick-Cell Anemia Linked to the Arab-Indian Haplotype in India. **Am J Hematol** **55**: 104-109.
- Nagel, R.L., Fabry, M.E., Pagnier, J., Zohoun, I., Wajcman H., Baudin, V. and Labie, D. (1985). Hematologically and Genetically Distinct Forms of Sick Cell Anemia in Africa. **N Engl J Med** **312**: 880-884.
- Nagel, R.L., Lin, M.J., Witkowska, H.E., Fabry, M.E., Bestak, M. and Hirsch, R.E. (1993). Compound Heterozygosity for Hemoglobin C and Korle-Bu: Moderate Microcytic Hemolytic Anemia and Acceleration of Crystal Formation. **Blood** **82**: 1907-1912.
- Orkin, S.H. (1978). The duplicated human α globin genes lie close together in cellular DNA. **Proc Natl Acad Sci USA** **75**: 5950-5954.
- Orkin, S.H. and Kazazian, H.H.J. (1984). The mutation and polymorphism of the human β -globin gene and its surrounding DNA. **Ann Rev Genet** **18**: 131-171.
- Pagnier, J., Mears, G., Dunda-Belkhodja, O., Schaefer-Rego, K.E., Beldjord C., Nagel, R. L. and Labie, D. (1984). Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. **Proc Natl Acad Sci USA** **81**: 1771-1773.
- Pagnier, J., Dunda-Belkhodja, O., Zohoun, I., Teyssier, J., Baya, H., Jaeger, G., Nagel, R.L. and Labie, D. (1984). α -Thalassemia among sickle cell anemia patients in various African populations. **Hum Genet** **68**: 318-319.
- Pembrey, M.E., MacWade, P. and Weatherall, D.J. (1972). Reliable routine estimation of small amounts of foetal haemoglobin by alkali denaturation. **J Clin Pathol** **25**: 738-740.

- Powars, D., Chan, L.S. and Schroeder, W.A. (1990). The Variable Expression of Sickle Cell Disease is Genetically Determined. **Semin Hematol** **27**: 360-376.
- Powars, D. and Hiti, A. (1993). β^S Gene Cluster Haplotypes as Genetic Markers for Severe Disease Expression. **AJDC** **147**: 1197-1202.
- Rodgers, G.P., Sahovic, E.A., Lawrence, E.P., Anagnou, N.P., Noguchi, C.T. and Schechter, N.A. (1986). Hemoglobin SC Disease and Alpha-Thalassemia. **Am J Med** **80**: 746-750.
- Sanchaisuriya, K., Fucharoen, G., Sae-ung, N., Siriratmanawong, N., Surapot, S. and Fucharoen, S. (2001). Molecular Characterization of Hemoglobin C in Thailand. **Am J Hematol** **67**: 189-193.
- Schroeder, W.A., Powars, D.R., Kay, L.M., Chan, L.S., Huynh, V., Shelton, J.B. and Shelton, J.R. (1989). β -Cluster Haplotypes, α -Gene Status, and Hematological Data From SS, SC, and S- β -Thalassemia patients in Southern California. **Hemoglobin** **13**: 325-353.
- Segbena, A.Y., Prehu, C., Wajcman, H., Bardakdjian-Michau, J., Messie, K., Feteke, L., Vovor, A., David, M., Feingold, J. and Galacteros, F. (1998). Hemoglobins in Togolese Newborns: Hb S, Hb C, Hb Bart's, and α -Globin Gene Status. **Am J Hematol** **59**: 208-213.
- Sonati, M.F., Farah, S.B., Ramalho, A.S. and Costa, F.F. (1991). High Prevalence of α -Thalassemia in a Black Population of Brazil. **Hemoglobin** **15**: 309-311.
- Sonati, M.F., Kimura, E.M. and Costa, F.F. (1992). Red Cell Indices and Alpha-Thalassemia. **Brazil J Genetics** **15**: 687-693.
- Sonati, M. F., Kimura, E. M., Grotto, H. Z. W., Gervasio, S. A. and Costa, F. F. (1996). Hereditary Hemoglobinopathies in a Population from Southeast Brazil. **Hemoglobin** **20**: 175-179.

- Stamatoyannopoulos, G., Nienhuis, A.W., Majerus, P.W. and Varmus, H. (1994). **The molecular bases of blood diseases**, 2nd ed. Saunders Company, Philadelphia.
- Steinberg, M.H. (1975). Haemoglobin C/ α Thalassaemia: Haematological and Bioynthetic Studies. **Br J Haematol 30**: 337-341.
- Steinberg, M.H., Coleman, M.B., Adams, J.G., Platica, O., Gillette, P. and Rieder, R.F. (1983). The effects of alpha-thalassaemia in HbSC disease. **Br J Hematol 55**: 487-492.
- Steinberg, M.H. (1991). The Interactions of α -Thalassemia with Hemoglobinopathies. **Hematol Oncol Clin North Am 5**: 453-473.
- Steinberg, M.H. (1994). Sickel Cell Anemia and Fetal Hemoglobin. **Am J Med Sci 308**: 259-265.
- Steinberg, M.H. (1995). Genetic Modulation of Sickel Cell Anemia. **PSEBM 209**: 1-13.
- Steinberg, M. H., Nagel, R. L., Lawrence, C., Swaminathan, V., Lu, Z. H., Plonczynski, M. and Harrell, A. (1996). β -Globin Gene Haplotype in Hb SC Disease. **Am J Hematol 52**: 189-191.
- Talacki, C.A., Rappaport, E., Schwartz, E., Surrey, S. and Ballas, S.K. (1990). β -Globin Gene Cluster Haplotypes in HbC Heterozygotes. **Hemoglobin 14**: 229-240.
- Trabuchet, G., Elion, J., Baudot, G., Pagnier, J., Bouhass, R., Nigon, V.M., Labie, D. and Krishnamoorthy, R. (1991). Origin and Spread of β -Globin Gene Mutations in India, Africa, and Mediterranean: Analysis of the 5' Flanking and Intragenic Sequences of β^S and β^C Genes. **Hum Biol 63**: 241-252.
- Trabuchet, G., Elion, J., Dunda, O., Lapoum roulie, C., Ducroq, R., Nadifi, S., Zohoun, I., Chaventre, A., Carnevale, P., Nagel, R.L., Krishnamoorthy, R. and Labie, D. (1991). Nucleotide sequence evidence of the unicentric origin of the β^C mutation in Africa. **Hum Genet 87**: 597-601.

- Travi, M., Cremonesi, L., Primignani, P., Di Benedetto, S., Testa, R., Schilirò, G. and Ferrari, M. (1992). Molecular Characterization of Hemoglobin C in Sicily. **Am J Hematol** **39**: 5-8.
- Walker, B.K., Atwater, J. and Ballas, S.K. (1979). Interaction of α -Thalassemia Genes with Each Other and with HbC in an American Black Family. **Biochem Genet** **17**: 1021-1029.
- Weatherall, D.J. & Clegg, J.B. (1981). **The Thalassemia Syndromes**, 3th ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- Williams, W.J., Beutler, E., Erslev, A.J. and Lichtman, M.A. (1990). **Hematology**, 4th ed. Mc Graw-Hill, Inc., New York.
- Wong, S.C., Ali, M.A.M. and Boyadjian, S.E. (1981). Sickle Cell Traits in Canada. **Acta Haematol** **65**: 157-163.
- Zago, M.A. and Costa, F.F. (1985). Hereditary haemoglobin disorders in Brazil. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg** **79**: 385-388.



ANEXOS

Relatório Estatístico – Comissão de Pesquisa – FCM - UNICAMP

Tabela 1. Tabelas de frequência das variáveis categóricas (Grupo AC)

TALASSEMIA				
TALASSE	Frequency	Cumulative Percent	Cumulative Frequency	Percent
n	113	83.09	113	83.09
s	23	16.91	136	100.00

GENÓTIPO ALFA				
GENALFA	Frequency	Cumulative Percent	Cumulative Frequency	Percent
het	21	15.44	21	15.44
homoz	2	1.47	23	16.91
nl	113	83.09	136	100.00

Tabela 2. Tabelas de frequência das variáveis categóricas (Grupo SC)

TALASSEMIA				
TALASSE	Frequency	Cumulative Percent	Cumulative Frequency	Percent
n	6	60.00	6	60.00
s	4	40.00	10	100.00

GENÓTIPO ALFA				
GENALFA	Frequency	Cumulative Percent	Cumulative Frequency	Percent
het	3	30.00	3	30.00
homoz	1	10.00	4	40.00
nl	6	60.00	10	100.00

Tabela 3. Tabelas de frequência das variáveis categóricas (Grupo CC)

TALASSEMIA				
TALASSE	Frequency	Cumulative Percent	Cumulative Frequency	Percent
n	3	100.00	3	100.00

GENÓTIPO ALFA				
GENALFA	Frequency	Cumulative Percent	Cumulative Frequency	Percent
nl	3	100.00	3	100.00

Tabela 4. Tabelas de frequência das variáveis categóricas (Geral)

GRUPO	Frequency	Cumulative Percent	Cumulative Frequency	Percent
AC	136	91.28	136	91.28
CC	3	2.01	139	93.29
SC	10	6.71	149	100.00

TALASSEMIA				
TALASSE	Frequency	Cumulative Percent	Cumulative Frequency	Percent
n	122	81.88	122	81.88
s	27	18.12	149	100.00

GENÓTIPO ALFA				
GENALFA	Frequency	Cumulative Percent	Cumulative Frequency	Percent
het	24	16.11	24	16.11
homoz	3	2.01	27	18.12
nl	122	81.88	149	100.00

Tabela 5. Estatísticas descritivas da variável VCM (Geral)

Grupo	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
Geral (AC+SC+CC)	149	84.1450	7.10677	61.6	83.3	107.0
Talassemia alfa normal	27 122	79.2037 85.2385	6.91512 6.69679	61.6 66.2	78.4 85.0	95.2 107.0

Teste de Mann-Whitney p-valor = **0.0001**

Tabela 6. Estatísticas descritivas da variável HCM (Geral)

Grupo	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
Geral (AC+SC+CC)	149	28.2946	2.45681	20.1	28.2	38
Talassemia alfa normal	27 122	26.3889 28.7164	2.47485 2.25320	20.1 23.2	26.8 28.5	31.9 38.0

Teste de Mann-Whitney p-valor = **0.0001**

Tabela 7. Estatísticas descritivas da variável %HbC (Grupo AC+SC)

Grupo	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
Geral (AC+SC)	144	37.5347	3.03730	26.4	37.9	43.5
Talassemia alfa normal	27 117	34.0000 38.3504	3.46543 2.25865	26.4 28.2	33.9 38.3	42.8 43.5

Teste de Mann-Whitney p-valor = **0.0001**

Tabela 8. Estatísticas descritivas da variável VCM (Grupo AC)

Grupo	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
AC	136	84.2375	6.55010	68.2	83.3	107.0
Talassemia alfa normal	23 113	80.1565 85.0681	6.25509 6.31765	68.2 71.0	79.6 84.9	95.2 107.0

Teste de Mann-Whitney p-valor = **0.0014**

Tabela 9. Estatísticas descritivas da variável HCM (Grupo AC)

Grupo	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
AC	136	28.3765	2.35609	22.1	28.2	38.0
Talassemia alfa	23	26.6000	2.23159	22.1	26.8	31.9
normal	113	28.7381	2.22102	23.2	28.5	38.0

Teste de Mann-Whitney p-valor = **0.0001**

Tabela 10. Estatísticas descritivas da variável %HbC (Grupo AC)

Grupo	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
AC	134	37.5321	3.02468	26.4	38.0	43.5
Talassemia alfa	23	33.5130	2.97861	26.4	33.9	37.9
normal	111	38.3649	2.28253	28.2	38.4	43.5

Teste de Mann-Whitney p-valor = **0.0001**

Tabela 11. Estatísticas descritivas da variável %HbF (Grupo AC)

Grupo	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
AC	136	1.01176	0.51136	0.3	0.9	4.6
Talassemia alfa	23	1.09130	0.85595	0.5	0.9	4.6
normal	113	0.99558	0.41196	0.3	0.9	2.6

Teste de Mann-Whitney p-valor = 0.5532

Tabela 12. Estatísticas descritivas da variável VCM (Grupo SC)

Grupo SC	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
Talassemia alfa	4	73.7250	8.97343	61.6	75.1	83.1
normal	6	89.5333	8.49627	78.0	89.6	103.0

Teste de Mann-Whitney Exato p-valor = **0.0190**

Tabela 13. Estatísticas descritivas da variável HCM (Grupo SC)

Grupo SC	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
Talassemia alfa	4	25.1750	3.77569	20.1	26.00	28.6
normal	6	28.9833	3.10575	25.5	28.75	34.0

Teste de Mann-Whitney Exato p-valor = 0.1714

Tabela 14. Estatísticas descritivas da variável %HbC (Grupo SC)

Grupo SC	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
Talassemia alfa	4	36.8000	5.17172	32.0	36.20	42.8
normal	6	38.0833	1.90936	36.8	37.45	41.9

Teste de Mann-Whitney Exato p-valor = 0.9143

Tabela 15. Estatísticas descritivas da variável %HbF (Grupo SC)

Grupo SC	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
Talassemia alfa	4	1.825	0.85391	0.6	2.1	2.5
normal	6	2.100	1.61245	0.8	1.5	5.2

Teste de Mann-Whitney Exato p-valor = 0.4571

Tabela 16. Comparação das proporções de Talassemia

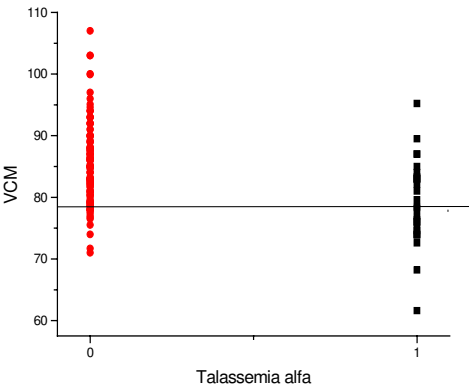
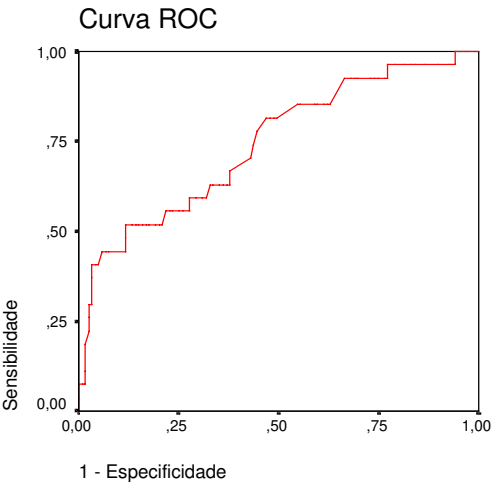
Grupo	%	n	p-valor
CA	16.91	136	0.3238
* População 1	23.50	47	

* Estudo realizado com 47 indivíduos negros, não relacionados, doadores de sangue da região de Campinas (Sudeste do Brasil), onde se confirmou a prevalência de 23,5% da deleção $-\alpha^{3.7}$ (Sonati e col., 1991).

Figura 1A - Curva ROC (Grupo total)

- VCM

TALASSEMIA	N
Positivo = 1	27
Negativo = 0	119



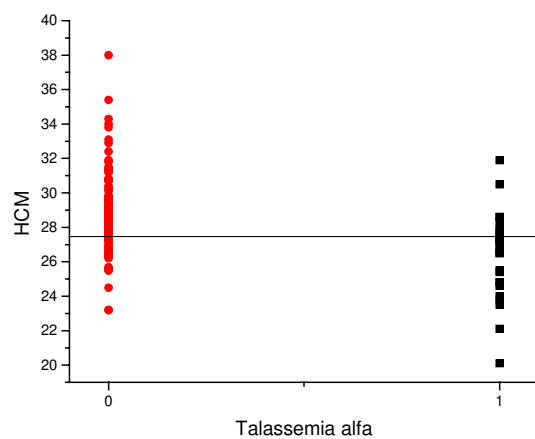
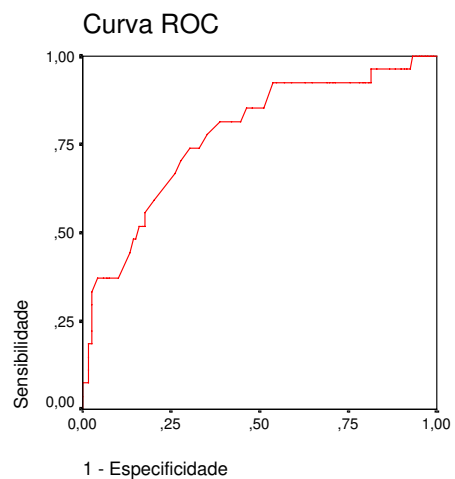
VCM	Sensibilidad	1 - Especificidad
60,600	,000	,000
64,900	,037	,000
69,600	,074	,000
71,350	,074	,008
72,150	,074	,017
73,250	,111	,017
73,950	,185	,017
74,300	,222	,025
74,850	,259	,025
75,300	,296	,025
75,750	,296	,034
76,150	,370	,034
76,400	,407	,034
76,600	,407	,042
76,850	,407	,050
77,200	,444	,059
77,550	,444	,067
77,850	,444	,076
78,100	,444	,118
78,300	,481	,118
(*) 78,450	,519	,118
78,550	,519	,134
78,650	,519	,143
78,800	,519	,151
78,950	,519	,160
79,050	,519	,168
79,150	,519	,176
79,250	,519	,193

79,350	,519	,202
79,500	,519	,210
79,800	,556	,218
80,150	,556	,227
80,350	,556	,235
80,600	,556	,252
80,850	,556	,261
80,950	,556	,277
81,050	,593	,277
81,400	,593	,294
81,850	,593	,311
82,050	,593	,319
82,150	,630	,328
82,300	,630	,336
82,500	,630	,353
82,650	,630	,361
82,750	,630	,370
82,850	,630	,378
82,950	,667	,378
83,050	,704	,429
83,200	,741	,437
83,650	,778	,445
84,300	,815	,471
84,700	,815	,479
84,850	,815	,487
84,950	,815	,496
85,150	,852	,546
85,650	,852	,555
86,100	,852	,588
86,250	,852	,597
86,350	,852	,613
86,500	,852	,622
86,800	,852	,630
87,250	,926	,664
87,600	,926	,681
87,750	,926	,689
87,900	,926	,697
88,100	,926	,731
88,550	,926	,739
88,950	,926	,748
89,100	,926	,765
89,350	,926	,773
89,700	,963	,773
89,950	,963	,790
90,500	,963	,815
91,450	,963	,832
91,950	,963	,840
92,500	,963	,866
93,500	,963	,899
94,300	,963	,924
94,850	,963	,933
95,150	,963	,941
95,600	1,000	,941
96,500	1,000	,950
98,450	1,000	,958
99,950	1,000	,966
101,500	1,000	,975
105,000	1,000	,992
108,000	1,000	1,000

Figura 1 B – Curva ROC (Grupo total)

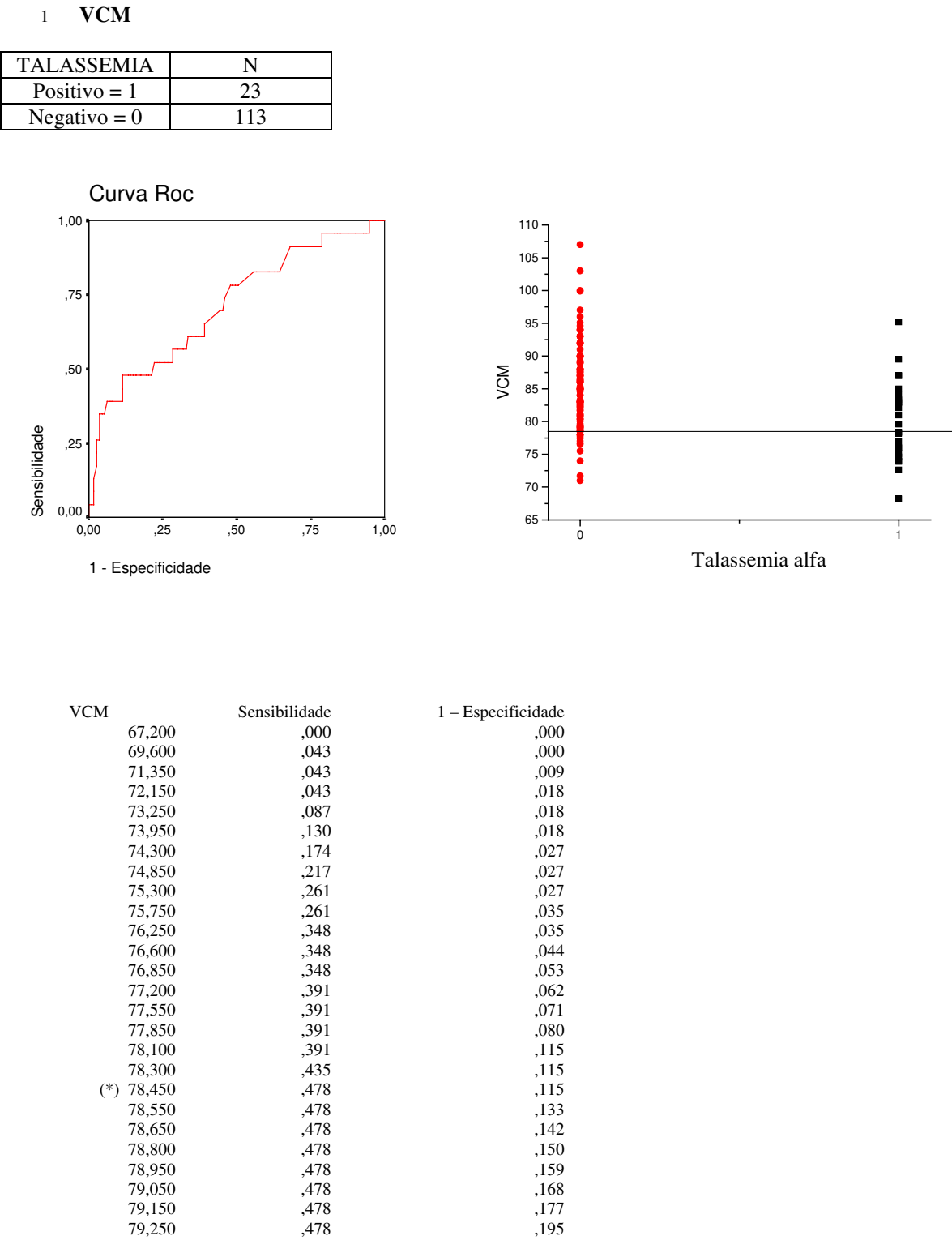
-HCM

TALASSEMIA	N
Positivo = 1	27
Negativo = 0	119



HCM	Sensibilidade	1 – Especificidade
19,100	,000	,000
21,100	,037	,000
22,650	,074	,000
23,350	,074	,017
23,650	,111	,017
23,900	,148	,017
24,250	,185	,017
24,550	,185	,025
24,700	,222	,025
25,100	,296	,025
25,450	,333	,025
25,550	,370	,042
25,650	,370	,059
25,950	,370	,067
26,250	,370	,076
26,400	,370	,101
26,550	,444	,134
26,650	,481	,143
26,750	,481	,151
26,850	,519	,160
26,950	,519	,168
27,050	,519	,176
27,150	,556	,176
27,250	,593	,202
27,350	,667	,261
27,500	,704	,277
(*) 27,650	,741	,303
27,750	,741	,328
27,850	,778	,353
28,000	,815	,387
28,150	,815	,420
28,250	,815	,445
28,350	,852	,462
28,450	,852	,479
28,550	,852	,513
28,650	,926	,538
28,750	,926	,546
28,850	,926	,571
28,950	,926	,588
29,050	,926	,630
29,150	,926	,647
29,250	,926	,689
29,350	,926	,697
29,450	,926	,706
29,550	,926	,714
29,700	,926	,756
29,950	,926	,782
30,150	,926	,790
30,250	,926	,798
30,350	,926	,807
30,450	,926	,815
30,600	,963	,815
30,750	,963	,832
31,000	,963	,866
31,250	,963	,882
31,350	,963	,899
31,450	,963	,908
31,650	,963	,916
31,850	,963	,924
32,150	1,000	,933
32,650	1,000	,941
33,000	1,000	,950
33,450	1,000	,958
33,900	1,000	,966
34,150	1,000	,975
34,850	1,000	,983
36,700	1,000	,992
39,000	1,000	1,000

Figura 2^A – Curva ROC (CA)

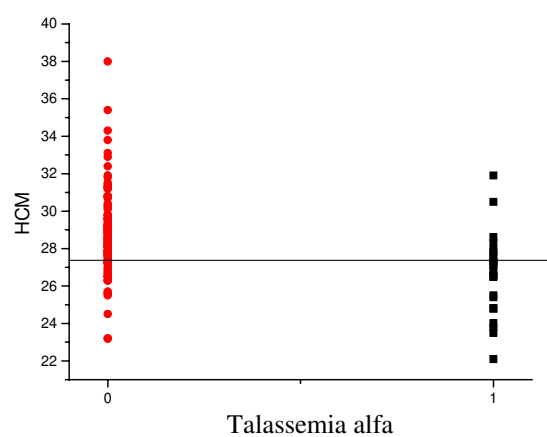
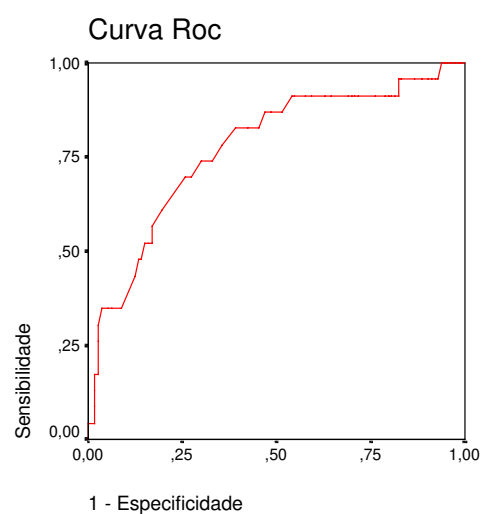


79,350	,478	,204
79,500	,478	,212
79,800	,522	,221
80,150	,522	,230
80,350	,522	,239
80,600	,522	,257
80,850	,522	,265
80,950	,522	,283
81,050	,565	,283
81,400	,565	,301
81,850	,565	,319
82,050	,565	,327
82,150	,609	,336
82,300	,609	,345
82,500	,609	,363
82,650	,609	,372
82,750	,609	,381
82,850	,609	,389
82,950	,652	,389
83,050	,696	,442
83,200	,696	,451
83,650	,739	,460
84,300	,783	,478
84,700	,783	,487
84,850	,783	,496
84,950	,783	,504
85,150	,826	,558
85,650	,826	,566
86,100	,826	,602
86,250	,826	,611
86,350	,826	,628
86,500	,826	,637
86,800	,826	,646
87,250	,913	,681
87,600	,913	,699
87,750	,913	,708
87,900	,913	,717
88,450	,913	,752
88,950	,913	,761
89,100	,913	,779
89,350	,913	,788
89,700	,957	,788
89,950	,957	,805
90,500	,957	,832
91,450	,957	,841
91,950	,957	,850
92,500	,957	,876
93,500	,957	,903
94,300	,957	,929
94,850	,957	,938
95,150	,957	,947
95,600	1,000	,947
96,500	1,000	,956
98,450	1,000	,965
99,950	1,000	,973
101,500	1,000	,982
105,000	1,000	,991
108,000	1,000	1,000

Figura 2B - Curva ROC (Grupo CA)

-HCM

TALASSEMIA	N
Positivo = 1	23
Negativo = 0	113



HCM	Sensibilidade	1 - Especificidade
21,100	,000	,000
22,650	,043	,000
23,350	,043	,018
23,650	,087	,018
23,900	,130	,018
24,250	,174	,018
24,650	,174	,027
25,100	,261	,027
25,450	,304	,027
25,550	,348	,035
25,650	,348	,053
26,000	,348	,062
26,400	,348	,088
26,550	,435	,124
26,650	,478	,133
26,750	,478	,142
26,850	,522	,150
26,950	,522	,159
27,050	,522	,168
27,150	,565	,168
27,250	,609	,195
(*) 27,350	,696	,257
27,500	,696	,274
27,650	,739	,301
27,750	,739	,327
27,850	,783	,354
28,000	,826	,389
28,150	,826	,425
28,250	,826	,451
28,350	,870	,469
28,450	,870	,487
28,550	,870	,513
28,650	,913	,540
28,750	,913	,549
28,850	,913	,575
28,950	,913	,593
29,050	,913	,628
29,150	,913	,646
29,250	,913	,690
29,350	,913	,699
29,450	,913	,708
29,550	,913	,717
29,700	,913	,761
29,950	,913	,788
30,150	,913	,796
30,250	,913	,805
30,350	,913	,814
30,450	,913	,823
30,600	,957	,823
30,750	,957	,832
31,000	,957	,867
31,250	,957	,885
31,350	,957	,903
31,450	,957	,912
31,650	,957	,920
31,850	,957	,929
32,150	1,000	,938
32,650	1,000	,947
33,000	1,000	,956
33,450	1,000	,965
34,050	1,000	,973
34,850	1,000	,982
36,700	1,000	,991
39,000	1,000	1,000

Pearson Correlation Coefficients	
Prob > r under H0: Rho=0	
Number of Observations	
	PHBC
VCM	0.45970
VCM	<.0001
	134

* O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para verificar a existência de correlação entre as variáveis VCM e %Hb C e assume valores de -1 a +1. Quanto mais próximo de zero, menos correlacionadas são as variáveis e, quanto mais próximo de 1 ou -1, mais correlacionadas são as variáveis

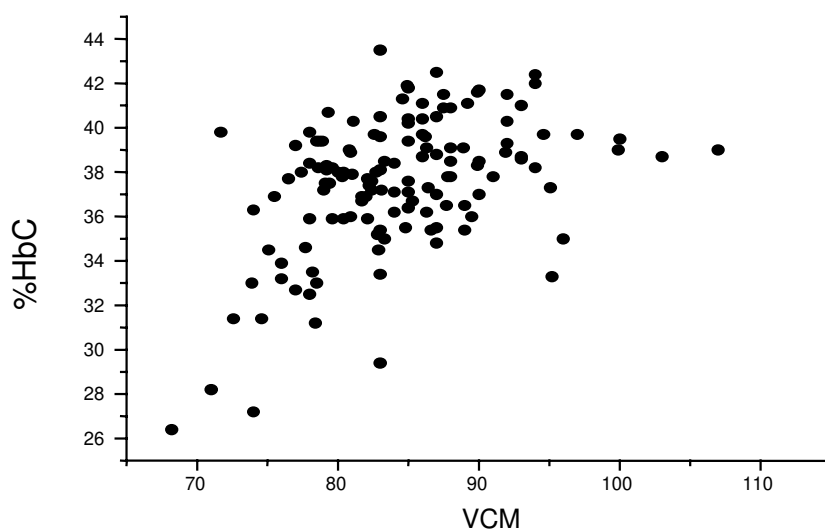


Figura 2. Diagrama de dispersão das variáveis VCM e %HbC (Grupo = CA)
($r = 0.45970$, $n = 134$)

INVESTIGAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS β^C

INTRODUÇÃO

A investigação dos polimorfismos associados a determinadas mutações tem auxiliado na obtenção de dados antropológicos e no diagnóstico de determinadas doenças (Maniatis e col., 1980; Orkin & Kazazian, 1984; Labie & Elion, 1996). No caso da anemia falciforme (SS), caracterizada por uma clínica muito variável, a análise dos haplótipos tornou-se uma ferramenta útil na elucidação desta variabilidade (Nagel e col., 1985; Powars e col., 1990; Powars & Hiti, 1993).

A determinação dos haplótipos ligados ao alelo β^C tem favorecido a hipótese de uma ocorrência da mutação na região Centro-Oeste da África (Boehm e col., 1985; Trabuchet e col., 1991), particularmente em Ghana e Volta. Nos tipos CI, CII e CIII, descritos por Boehm e col., 1985, o sítio de restrição Hpa I na região 3' do *cluster* β está ausente, mas há descrições da presença deste sítio em haplótipos atípicos (Talacki e col., 1990; Trabuchet e col., 1991; Travi e col., 1992; Steinberg e col., 1996). O primeiro é o mais prevalente e encontrado em todas as populações estudadas (Schroeder e col., 1989; Talacki e col., 1990; Trabuchet e col., 1991; Travi e col., 1992; Steinberg e col., 1996; Lee e col., 1998). O CII, assim como o CIII e outros mais raros, provavelmente surgiu por evento de recombinação entre os subhaplótipos 5' e 3' (Chakravarti e col., 1984).

Recentemente, a caracterização molecular da Hb C na Tailândia tem sugerido uma outra origem da mutação nesta região, associada a um único haplótipo (Sanchaisuriya e col., 2001).

Paralelamente ao trabalho de tese, dois sítios de restrição no *cluster* β (Hind III no IVS 2 do gene G_γ e Hinc II na região 3' do $\psi\beta$), ligados à mutação β^C , foram investigados nas 149 amostras obtidas (136 AC, 10 SC e 3 CC), com o objetivo de avaliar a prevalência dos diferentes haplótipos e uma possível influência de cada sítio nos parâmetros hematológicos (VCM e HCM), no percentual de Hb anômala formada e nos níveis de Hb F.

METODOLOGIA

Os 2 sítios polimórficos no cluster β (Hind III no IVS 2 do gene G_γ e Hinc II na região 3' do $\psi\beta$) foram analisados por PCR e digestão com as correspondentes enzimas de restrição (Sutton e col., 1989).

As variáveis VCM, HCM, % Hb C e % Hb F foram comparadas entre os genótipos de cada sítio (+/+, +/- e -/-) por meio dos testes estatísticos não-paramétricos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney.

RESULTADOS PARCIAIS

Os genótipos encontrados para os 2 sítios de restrição analisados e suas frequências estão representados nas Tabelas 1-3. Foram determinados 143 genótipos para Hind III e 146 genótipos para Hinc II.

A variável VCM ($p=0.024$) diferiu entre os genótipos +/+ e +/- do sítio Hind III, dentro do grupo portador da deleção $-\alpha^{3.7}$ (Tabela 4), mas esta diferença não se manteve quando os homozigotos ($-\alpha/-\alpha$) foram excluídos da comparação ($p=0.078$) (Tabela 5). As médias dos percentuais de Hb F diferiram significativamente entre os genótipos do sítio Hinc II, dentro do grupo talassêmico (Tabela 6), mesmo quando analisados apenas os heterozigotos AC e excluído um caso com percentual de Hb F de 4,6% (Tabela 7).

DISCUSSÃO

Os haplótipos ligados à mutação β^C não puderam ser inferidos apenas com a análise dos sítios Hind III no IVS 2 do gene G_γ e Hinc II na região 3' do $\psi\beta$. Embora a combinação entre eles diferencie os tipos CI (+ +), CII (- +) e CIII (- -), descritos por Boehm e col (1985), há descrições de padrões similares associados à presença do sítio de restrição Hpa I na região 3' do *cluster* β em haplótipos atípicos (Talacki e col., 1990; Trabuchet e col., 1991; Travi e col., 1992; Steinberg e col., 1996).

Dos parâmetros analisados estatisticamente, apenas os percentuais de Hb F, dentro do grupo com talassemia α , diferiram entre os genótipos +/+ e +/- do sítio Hinc II,

sugerindo uma possível influência deste polimorfismo na produção de Hb F. A média dos níveis desta hemoglobina na presença do sítio em homozigose foi levemente mais alta, mas menor que 2%. A diferença encontrada pode ser decorrente do pequeno tamanho amostral, já que não foi demonstrada no grupo sem a deleção. O número de casos deve ser ampliado para a obtenção de uma análise estatística mais consistente.

Pretende-se ainda investigar outros sítios de restrição e, quando possível, realizar a análise familiar para a determinação dos haplótipos.

Tabela 1. Frequências dos genótipos de HindIII e HincII (Grupo AC)

HIND III				
HINDIII	Frequency	Percent	Cumulative Frequency	Cumulative Percent
+/+	54	40.91	54	40.91
+/-	70	53.03	124	93.94
-/-	8	6.06	132	100.00
Frequency Missing = 4				
HINC II				
HINCII	Frequency	Percent	Cumulative Frequency	Cumulative Percent
+/+	81	60.45	81	60.45
+/-	52	38.81	133	99.25
-/-	1	0.75	134	100.00
Frequency Missing = 2				

Tabela 2. Frequências dos genótipos de HindIII e HincII (Grupo CC)

HIND III				
HINDIII	Frequency	Cumulative Percent	Cumulative Frequency	Percent
+/+	3	100.00	3	100.00

HINC II				
HINCII	Frequency	Cumulative Percent	Cumulative Frequency	Percent
+/+	3	100.00	3	100.00

Tabela 3. Frequências dos genótipos de HindIII e HincII (Grupo SC)

HIND III				
HINDIII	Frequency	Cumulative Percent	Cumulative Frequency	Percent
+/+	3	37.50	3	37.50
+/-	5	62.50	8	100.00
Frequency Missing = 2				

HINC II				
HINCII	Frequency	Cumulative Percent	Cumulative Frequency	Percent
+/+	4	44.44	4	44.44
+/-	4	88.89	8	88.89
-/-	1	100.00	9	100.00
Frequency Missing = 1				

Tabela 4. Estatísticas descritivas da variável VCM (Grupo = talassemia)

Hind III	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
+/+	9	83.4889	6.84972	73.9	84.0	95.2
+/-	15	76.5333	6.23363	61.6	76.0	85.0

Teste de Mann-Whitney Exato **p-valor = 0.0240**

Tabela 5. Estatísticas descritivas da variável VCM (Grupo = genótipo $-\alpha/\alpha\alpha$)

Hind III	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
+/+	9	83.4889	6.84972	73.9	84.00	95.2
+/-	12	78.6833	4.15251	72.6	77.35	85.0

Teste de Mann-Whitney Exato **p-valor = 0.0781**

Tabela 6. Estatísticas descritivas da variável % HbF (Grupo = talassemia α)

Hinc II	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
+/+	14	1.47857	1.03491	0.5	1.05	4.6
+/-	12	0.76667	0.32845	0.5	0.60	1.5

Teste de Mann-Whitney Exato **p-valor = 0.0033**

Tabela 7. Estatísticas descritivas da variável %HbF (Grupo = AC com talassemia α)

Hinc II	N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
+/+	11	1.08182	0.39955	0.5	1.0	1.8
+/-	11	0.78182	0.34005	0.5	0.6	1.5

Teste de Mann-Whitney Exato **p-valor = 0.0307**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boehm, C.D., Dowling, C.E., Antonarakis, S.E., Honig, G.R. and Kazazian, H.H. (1985). Evidence supporting a single origin of the β^C -globin gene in blacks. **Am J Hum Genet** **37**: 771-777.
- Chakravarti, A., Buetow, K., Antonarakis, S.E., Waber, P.G., Boehm, C.D. and Kazazian, H.H. (1984). Nonuniform Recombination within the Human β -Globin Gene Cluster. **Am J Hum Genet** **36**: 1239-1258).
- Labie, D. and Elion, J. (1996). Sequence Polymorphisms of Potencial Funtional Relevance in the β -Globin Genes Locus. **Hemoglobin** **20**: 85-101.
- Maniatis, T., Fritsch E.F., Lauer J. and Lawn R.M. (1980). The Molecular Genetics of Human Hemoglobins. **Ann Rev Genet** **14**: 145-178.
- Nagel, R. L., Fabry, M. E., Pagnier, J. Zohoun, I., Wajcman H., Baudin, V. and Labie, D. (1985). Hematologically and Genetically Distinct Forms of Sickle Cell Anemia in Africa. **N Engl J Med** **312**: 880-884.
- Lee, K., Préhu, C., Mérault, G., Kéclard, L., Roudot-Thoraval, F., Bachir, D., Wajcman, H., Denis, L. and Galactéros, F. (1998). Genetic and Hematological Studies in a Group of 114 Adult Patients With SC Sickle Cell Disease. **Am J Hematol** **59**: 15-21.
- Orkin, S.H. and Kazazian, H.H.J. (1984). The mutation and polymorfism of the human β -globin gene and its surrounding DNA. **Ann Rev Genet** **18**: 131-171.
- Powars, D., Chan, L.S. and Schroeder, W.A. (1990). The Variable Expression of Sickle Cell Disease is Genetically Determined. **Semin Hematol** **27**: 360-376.

- Powars, D. and Hiti, A. (1993). β^S Gene Cluster Haplotypes as Genetic Markers for Severe Disease Expression. **AJDC** **147**: 1197-1202.
- Sanchaisuriya, K., Fucharoen, G., Sae-ung, N., Siriratmanawong, N., Surapot, S. and Fucharoen, S. (2001). Molecular Characterization of Hemoglobin C in Thailand. **Am J Hematol** **67**: 189-193.
- Schroeder, W.A., Powars, D.R., Kay, L.M., Chan, L.S., Huynh, V., Shelton, J.B. and Shelton, J.R. (1989). β -Cluster Haplotypes, α -Gene Status, and Hematological Data From SS, SC, and S- β -Thalassemia patients in Southern California. **Hemoglobin** **13**: 325-353.
- Steinberg, M.H., Nagel, R.L., Lawrence, C., Swaminathan, V., Lu, Z.H., Plonczynski, M. and Harrell, A. (1996). β -Globin Gene Haplotype in Hb SC Disease. **Am J Hematol** **52**: 189-191.
- Sutton, M., Bouhassira, E.E. and Nagel, R.L. (1989). Polymerase Chain Reaction Amplification Applied to the Determination of β -like Globin Gene Cluster Haplotypes. **Am J Hematol** **32**: 66-69.
- Talacki, C.A., Rappaport, E., Schwartz, E., Surrey, S. and Ballas, S.K. (1990). β -Globin Gene Cluster Haplotypes in HbC Heterozygotes. **Hemoglobin** **14**: 229-240.
- Trabuchet, G., Elion, J., Dunda, O., Lapoum  roulie, C., Ducroq, R., Nadifi, S., Zohoun, I., Chaventre, A., Carnevale, P., Nagel, R.L., Krishnamoorthy, R. and Labie, D. (1991). Nucleotide sequence evidence of the unicentric origin of the β^C mutation in Africa. **Hum Genet** **87**: 597-601.
- Travi, M., Cremonesi, L., Primignani, P., Di Benedetto, S., Testa, R., Schilir  , G. and Ferrari, M. (1992). Molecular Characterization of Hemoglobin C in Sicily. **Am J Hematol** **39**: 5-8.