

MARCOS ANDRÉ CAVALCANTI BEZERRA

**Aspectos Clínicos, Bioquímicos e Moleculares
das Síndromes Talassêmicas em População do
Estado de Pernambuco**



**UNICAMP
CAMPINAS**

2007

Aspectos Clínicos, Bioquímicos e Moleculares das Síndromes Talassêmicas em População do Estado de Pernambuco

Aluno: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

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

CAMPINAS

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B469a Bezerra, Marcos André Cavalcanti
Aspectos clínicos, bioquímicos e moleculares das síndromes
talassêmicas em população do Estado de Pernambuco / Marcos André
Cavalcanti Bezerra. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Fernando Ferreira Costa
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Talassemia beta. 2. Genótipo. 3. Fenótipo. I. Costa,
Fernando Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Clinical, Biochemical and Molecular aspects of the Talassemic Syndromes in the Population of Pernambuco State

Keywords: • Beta talassemia

- Genotype
- Phenotype

Área de concentração : Ciências Básicas

Titulação: Mestrado em Clínica Médica

Banca examinadora: Prof Dr Fernando Ferreira Costa

Profa. Dra. Helena Zertotti Wolf Grotto

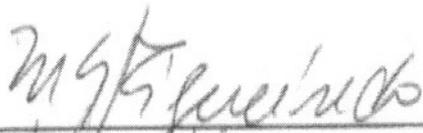
Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo

Data da defesa: 29-01-2007

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Fernando Ferreira Costa

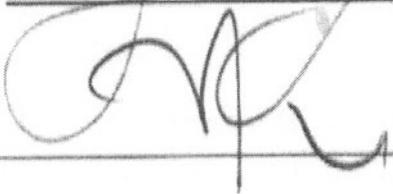
Professora Doutora Maria Stella Figueiredo



Professora Doutora Helena Zerlotti Wolf Grotto



Professora Doutor Fernando Ferreira Costa



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

Data: 29/01/2007

200728523

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cláudio e Edna, por nunca medirem esforços para me ajudar, incentivo e apoio em todas as etapas da minha vida. Pelo grande amor e por serem essenciais na minha vida.

Aos meus irmãos, Júnior e Gleidson, pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

À minha esposa, Mariana, pelo estímulo, paciência e muito amor.

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr. Fernando Costa**, pela orientação, compreensão, amizade, profissionalismo e por todos os ensinamentos transmitidos durante os anos de convívio.

Ao **Dr. Aderson Araújo**, meu co-orientador, pelo incentivo, amizade, compreensão, confiança e apoio demonstrados durante os anos de convivência.

A **Dra. Maria de Fátima Sonati**, pelo desprendimento em compartilhar conhecimentos e a inestimável ajuda nas várias etapas deste trabalho.

A **Dulcinéia**, pela ajuda, incentivo e disponibilidade em ensinar. Pelas dicas, paciência e amizade. Pelos bons momentos vividos nesses anos de convívio.

A **Ângela e Helô**, pela amizade, disponibilidade e auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Hemoglobina e Genoma, **Anderson, Sheley, Carol, Flávia, Ucha, Carla, Letícia e Nicola**, pela amizade, carinho, e auxílios técnicos e científicos na realização deste trabalho.

A **Magnum**, por sua participação direta neste trabalho, sempre prestativo. Pela disponibilidade na coleta e envio do material genético dos pacientes desse estudo. Pela amizade e momentos de descontração.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas, **Elza, Denise, Felipe e Susan**, pelo precioso auxílio prestado durante a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Hemoglobinopatias do Hemope, **Ivane, Betânia, Leda, Josefa e Bruno**, por serem sempre prestativos e dispostos a colaborar.

Aos médicos hematologistas da Fundação Hemope, **Dra. Jaqueline, Dra. Flavia, Dra. Creusa, Dra. Fátima Araújo, Dra. Graça Carvalho, Dra. Fábila, Dra. Ana Fausta**, pelo acompanhamento dos pacientes e por estarem sempre dispostos a ajudar.

À **CAPES**, pelo suporte financeiro.

A minha esposa, **Mariana**, pelo amor, carinho, principalmente compreensão e paciência. Por sempre está presente em todos os momentos e em qualquer situação.

Aos meus amigos de Recife, **Emanuel, Roberto, Germano, Otoni, Jefferson, Kaliny, Liciano, Pollyanna, Jemima, Shana**, que mesmo à distância me apoiaram e me incentivaram.

A meus pais **Cláudio e Edna** pelo amor e dedicação incondicionais, e a meus irmãos **Júnior e Gleidson**, por sempre me apoiarem e fazer parte dessa família que eu adoro.

A **todos os meus familiares**, por todo carinho, amor e incentivo a mim dispensados.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxi
RESUMO	xxv
ABSTRACT	xxix
INTRODUÇÃO.....	33
1.1- Formas clínicas da talassemia beta.....	35
1.2- Incidência da Talassemia β	37
1.3- Interação S/ β talassemia.....	37
1.4- Bases moleculares da talassemia β	38
1.5- Talassemia β Intermediária	41
1.6- Fisiopatologia da talassemia β intermediária	43
1.7- Fatores moduladores de gravidade na talassemia β	43
1.7.1- Mutação β talassêmica	44
1.7.2- Genótipo α	44
1.8- Talassemia alfa na doença falciforme	45
1.9-Variação na produção de Hb Fetal	46
1.10- Haplótipos β^{Tal}	47
1.11- Haplótipos β^{S}	48
1.12- Modificadores não-globínicos na talassemia β	48
OBJETIVOS.....	51
Objetivo Geral	53
Objetivos Específicos	53
PACIENTES E MÉTODOS.....	55
2.1- Casuística	57
2.2- Aspectos Éticos da Pesquisa	57
2.3- Análise Hematológica, Bioquímica e Clínica	57
2.4- Extração do DNA genômico	58

2.5- Reação de Amplificação (PCR)	59
2.6- Determinação dos Haplótipos β^S e $\beta^{Tal.}$ - PCR e Análise de Restrição.....	59
2.7- RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism (Análise de Restrição)	63
2.8- Detecção das Mutações β Talassêmicas - PCR e Seqüenciamento	64
2.9- Estratégia para rastreamento de mutações (Figura 4) na talassemia β	65
2.10- Seqüenciamento	66
2.11- Genótipo α - Gap-PCR / PCR-Análise de restrição.....	67
2.12- Detecção do Polimorfismo $(TA)_n$ – Síndrome de Gilbert - Genotipagem	68
RESULTADOS	71
CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
ANEXOS	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferentes mecanismos moleculares que causam talassemia β	39
Figura 2: <i>Cluster</i> β mostrando os sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β^S segundo Sutton et al. (1989).....	60
Figura 3: <i>Cluster</i> β mostrando os sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β^{tal} segundo Orkin et al. (1982). A seta em destaque (\rightarrow) indica o polimorfismo -158 (C \rightarrow T) 5' γ^G (<i>Xmn</i> I).....	60
Figura 4: Esquema do Gene da Beta-Globina Humana – Cromossomo 11, com a estratégia para rastreamento de mutações na talassemia β . (Legenda - Ex: Éxon; IVS-I: Íntron I; IVS-II: Íntron II).	65
Figura 5 - Eletroferograma do gene da globina β humana, identificando a mutação para talassemia β . A. Fita sense normal de uma região do éxon 1; B. Fita sense com a deleção de um nucleotídeo C no códon 12, com a formação de um <i>stop códon</i> no códon 18. Produto de PCR clonado em vetor pGEM-T easy vector (PROMEGA).....	77
Figura 6: Análise por PCR do gene da globina α humana, com a identificação da deleção ($-\alpha^{3.7\text{ kb}}$).....	82
Figura 7: Análise por PCR do gene da globina α humana, com a identificação da triplicação do gene α	84
Figura 8: Análise por PCR do Polimorfismo -158 γ^G (C \rightarrow T) <i>Xmn</i> I.	84
Figura 9: Eletroferograma da fita antisense do gene da globina β humana. A. Fita antisense normal de uma região do éxon 3. B. Fita antisense com a mutação no códon 122 (TTC \rightarrow TCC) do éxon 3.	90
Figura 10: Heredograma da família da Hb Caruaru. \rightarrow Caso descrito.....	91
Figura 11: Eletroferograma da fita sense do gene da globina β humana. A. Fita sense normal de uma região do éxon 1. B. Fita sense com a deleção Códon 22/23/24/25 (-12pb: -GAAGTTGGTGGT) do éxon 1. Produto de PCR clonado em vetor pGEM-T easy vector (PROMEGA).....	92
Figura 12: Heredograma da família da Hb Olinda.	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Primers</i> utilizados para amplificação de regiões do <i>cluster</i> β : localização referente ao <i>cluster</i> β no cromossomo 11 depositados no banco de dados NCBI (ID: U01317).....	61
Tabela 2: Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do <i>cluster</i> da globina β	62
Tabela 3: Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do <i>cluster</i> da globina β	63
Tabela 4: Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição.....	64
Tabela 5: <i>Primers</i> utilizados para amplificação do gene β : localização referente ao <i>cluster</i> β no cromossomo 11 (ID: U01317).....	65
Tabela 6: <i>Primers</i> utilizados para seqüenciamento do gene β : localização referente ao <i>cluster</i> β no cromossomo 11 (ID: U01317).....	66
Tabela 7: Seqüências dos <i>primers</i> para pesquisa da deleção $\alpha^{3,7Kb}$ e do $\alpha\alpha\alpha^{anti\ 3,7kb}$. Localização referente ao gene α no cromossomo 16 depositados no banco de dados NCBI (ID: J00153).....	68
Tabela 8: Os <i>primers</i> utilizados na amplificação da região promotora do gene <i>UGT1A1</i> . As seqüências utilizadas são referentes ao <i>locus</i> do gene <i>UGT1</i> depositadas no banco de dados NCBI (ID:AF297093).....	69
Tabela 9: Distribuição das mutações da talassemia β em pacientes com talassemia β homozigota e S/ β Talassemia em PE (n = 47 β tal + 70 S/ β tal).....	73
Tabela 10: Distribuição dos genótipos nos pacientes com talassemia β maior e talassemia β intermediária (n=47).....	74
Tabela 11: Frequência alelica das mutações nos pacientes com talassemia β maior e talassemia β intermediária (n=47).....	75
Tabela 12: Descrição dos dados hematológicos e moleculares da família em estudo.	76
Tabela 13: Distribuição genotípica dos portadores de S/ β talassemia em Pernambuco (n=70).....	78

Tabela 14: Distribuição das mutações da talassemia β e seus respectivos haplótipos.	79
Tabela 15: Distribuição dos genótipos, fenótipos e haplótipos β^{tal} (n=47).	80
Tabela 16: Mutações β talassêmicas e os haplótipos β^S / β^{Tal} nos pacientes com a interação S/ β talassemia (n=70).	81
Tabela 17: Genótipo da talassemia β nos pacientes que apresentaram a $-\alpha^{3.7 kb}$	83
Tabela 18: Genótipo da S/ β talassemia nos pacientes que apresentaram a $-\alpha^{3.7 kb}$	83
Tabela 19: Genótipo da S/ β talassemia nos pacientes que apresentaram a $\alpha\alpha\alpha^{anti 3,7kb}$	83
Tabela 20: Dados hematológicos e bioquímicos dos pacientes homozigotos para a mutação $\beta^+ IVS-I-6 (T \rightarrow C)$ n=30.	85
Tabela 21: Comparação dos dados hematológicos de pacientes $\beta^S/\beta^{tal} IVS-I-5$ e $\beta^S/\beta^{tal} IVS-I-6$	86
Tabela 22: Comparação dos dados clínicos de pacientes $\beta^S/\beta^{tal} IVS-I-5$ e $\beta^S/\beta^{tal} IVS-I-6$	87
Tabela 23: Frequência dos alelos <i>UGT1A1</i> nos 117 pacientes (47 homozigotos para talassemia β e 70 S/ β talassêmicos).	87
Tabela 24: Genótipos no promotor do gene <i>UGT1A1</i> nos 117 pacientes (47 homozigotos para talassemia β e 70 S/ β talassêmicos).	88
Tabela 25: Níveis de bilirrubina indireta e a frequência de colelitíase nos três grupos.	88
Tabela 26: Distribuição molecular das mutações mais frequentes da talassemia β no estado de São Paulo, Rio Grande do Sul e Pernambuco.	99

LISTA DE ABREVIATURAS

α - Alfa

ABRASTA - Associação Brasileira de Talassêmicos

AVC - Acidente vascular cerebral

ATP – Atípico

β - Beta

β^A - Alelo beta normal

β^S - Alelo beta S

β^+ - Beta mais

β^0 - Beta zero

β tal - Talassemia beta

BI - Bilirrubina indireta

CAR – República centro africana

CAM - Camarões

Cd – Códon

δ - Delta

dl - Decilitros

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTPs - Desoxirribonucleótidos trifosfato

ϵ - Épsilon

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

γ^G - Gama G

γ^A - Gama A

Hb – Hemoglobina

HbA - Hemoglobina A

Hb A₂ - Hemoglobina A₂

HCM - Hemoglobina corpuscular média

Hb Fetal - Hemoglobina Fetal

Hm - Contagem de hemácias

HBB*S - Gene da hemoglobina S
HPLC - Cromatografia líquida de alta performance
IVS – Íntron
Kb - kilobase de DNA
 μ l – Microlitros
ml - Mililitros
ng - Nanogramas
OMS - Organização Mundial de Saúde
 $\phi\beta$ - Pseudo beta
pb - Pares de base
PCR - Reação em cadeia da polimerase
pg - Picogramas
PHHF - Persistência hereditária de Hemoglobina Fetal
Ret - Reticulócitos
RNA - Ácido ribonucléico
RNA_m - RNA mensageiro
rpm - Rotações por minuto
S/ β tal - Interação anemia falciforme / talassemia beta
SDS - Duodecil sulfato de sódio
TKM1/TKM2 - “Tris, KCl e MgCl₂ buffer” Tampões de lise celular
Tris - Tris (hidroximetil) aminometano
UGT – Uridino glucuronosil transferase
VCM - Volume corpuscular médio

RESUMO

A talassemia β é uma doença hereditária freqüente da Hb e tem sido encontrada em praticamente todas as populações estudadas. A ocorrência dessas síndromes no Brasil tem sido estudada ao longo do tempo, entretanto, por causa das limitações nas metodologias utilizadas em muitas pesquisas, os dados de prevalência e diversidade são incompletos. Além disso, como conseqüência da composição étnica do nosso país, miscigenada por elementos de origens européia, africana, asiática e indígena, e desigualmente distribuída, a incidência da talassemia pode variar de região para região. Este estudo tem como objetivo mostrar características clínicas, bioquímicas e moleculares das síndromes talassêmicas em população do estado de Pernambuco. Foram estudados 117 pacientes não relacionados, sendo 11 diagnosticados com talassemia β maior, 36 talassemia β intermediária e 70 com a interação S/ β talassemia, acompanhados na Fundação HEMOPE. A caracterização molecular foi feita por técnicas de PCR e seqüenciamento. A caracterização dos alelos β talassêmicos revelou 15 diferentes mutações, sendo que 4 delas correspondem a 84,3% dos alelos β talassêmicos, nas seguintes proporções: 54,9% IVS-I-6 (T \rightarrow C), 15,2% IVS-I-5 (G \rightarrow C), 7,9% códon 39 (C \rightarrow T) e 6,1% IVS-I-1 (G \rightarrow A). Foram encontradas outras mutações raras, pela primeira vez descritas no Brasil: IVS-II-849 (A \rightarrow G), poli-A (T \rightarrow C), - 29 (A \rightarrow G), Códon 30 (A \rightarrow C), IVS-I-2 (T \rightarrow C), IVS-II-837 (T \rightarrow G), Códon 106/107 (+G), além das mutações IVS-I-5 (G \rightarrow A) e -88 (C \rightarrow T). Uma nova mutação foi descrita: códon 12 (-C). Foram encontrados 30 pacientes homozigotos IVS-I-6 (T \rightarrow C) e tal mutação mostrou uma forte associação com o haplótipo VI. A mutação IVS-I-5 (G \rightarrow C) esteve relacionada ao haplótipo I, diferentemente do encontrado em outras populações (haplótipo VII) em que esta mutação é prevalente, podendo sugerir uma origem diferente para esta mutação no Brasil. A deleção $-\alpha^{3.7 \text{ kb}}$ esteve presente em 4,2% dos pacientes homozigotos para talassemia β e em 15,7% dos S/ β tal, enquanto a $\alpha\alpha^{\text{anti}3.7\text{kb}}$ foi encontrada em 5,7% dos S/ β tal. O polimorfismo *XmnI* esteve presente em 6,1% dos pacientes com β tal homozigota e em apenas 1,4% dos S/ β tal. Com relação ao alelo *UGT1A1*, foi visto que pacientes com genótipos (TA)₇ / (TA)₇ e (TA)₇ / (TA)₈ apresentaram maiores níveis de bilirrubina não conjugada e parecem ter maior

probabilidade de desenvolver colelitíase. No Brasil, embora a composição étnica da população seja heterogênea, as mutações mais comuns são de origem Mediterrânea; Pernambuco pode ser considerado uma exceção já que cerca de 16,0% da população talassêmica possui mutações de origem Asiática e 10,8% são de origem africana. A diversidade de mutações e suas respectivas freqüências diferem do encontrado em outras populações brasileiras já estudadas, como a do Sudeste, onde 4 mutações também respondem pela maioria (97%) dos casos, porém a mutação predominante é a β^{039} (C→T).

ABSTRACT

β Thalassemia is a frequent inherited disease of the Hb molecule found in the majority of populations and distributed worldwide. The prevalence of this syndrome in Brazil has been studied for a long time, but due to limitations in the methodology of some research, data on prevalence and clinical diversity are not fully complete. Furthermore, as a consequence of our ethnic composition, mixed with an uneven distribution of European, African, Asian and Indian native populations, the incidence of thalassemia may vary greatly from one region to another. This study aims to show clinical features, and also biochemical and molecular data of our thalassemia syndromes in a population setting of thalassemia patients in the State of Pernambuco. We studied 117 non-related patients, 11 of them with β thalassemia major, 36 β with thalassemia intermedia and 70 with the S/ β thalassemia interaction, followed regularly at the Fundação HEMOPE – Recife - Brazil. Molecular characterization was performed by PCR techniques and DNA sequencing. Characterization of β thalassemia alleles showed 15 different mutations, 4 of which corresponded to 84.3% of the β thalassemia alleles, in the following proportions: 54.9% IVS-I-6 (T→C), 15.2% IVS-I-5 (G→C), 7.9% codon 39 (C→T) and 6.1% IVS-I-1 (G→A). Other rare mutations were found and for the first time in Brazil, such as: IVS-II-849 (A→G), poly-A (T→C), -29 (A→G), codon 30 (A→C), IVS-I-2 (T→C), IVS-II-837 (T→G), codons 106/107 (+G), as well as IVS-I-5 (G→A) and -88 (C→T) mutations. A new mutation is also described: codon 12 (-C). We found 30 homozygous patients for the IVS-I-6 (T→C) mutation, which showed a strong association with the β gene haplotype VI. The IVS-I-5 (G→C) mutation was related to the β gene haplotype I, differently from that found in other populations studied (β haplotype VII) where it is more prevalent, suggesting a different origin for this mutation in Brazil. The $-\alpha^{3.7\text{ kb}}$ deletion was present in 4.2% of β thalassemia homozygous patients and in 15.7% of the S/ β thalassemia patients, whereas the $\alpha\alpha^{\text{anti}3.7\text{ kb}}$ was found in 5.7% of them. The *Xmn*I polymorphism was present in 6.1% of the homozygous β thalassemia patients and in only 1.4% of the S/ β thalassemia individuals. In relation to the *UGT1A1* allele, we found that patients with genotypes (TA)₇ / (TA)₇ and (TA)₇ / (TA)₈ showed higher levels of non-conjugated bilirubin and seem to be more prone to developing

gall stones. In Brazil, although the ethnic composition is markedly heterogeneous, the most common mutations are of Mediterranean origin; Pernambuco may be a curious exception to this, since around 16.0% of the thalassemia population have mutations of Asian origin and 10.8% of African origin. In conclusion, the diversity of the mutations found and their frequencies greatly differ from those found in other Brazilian populations studied previously, for example in the Southeast where only four thalassemia mutations are responsible for the majority (97%) of the thalassemia cases, although the commonest mutation is the β^{039} (C→T).

Introdução

Mutações em genes de cadeias globínicas resultam na produção de proteínas anômalas (hemoglobinopatias estruturais) ou na redução ou ausência de síntese de um ou mais tipos de cadeias globínicas (talassemias), constituindo assim as hemoglobinopatias hereditárias (Bunn e Forget, 1986).

Hemoglobinopatias estruturais são, geralmente, causadas por mutações de ponto ou pequenas inserções ou deleções de bases, afetando a região codificadora do gene e causando a substituição de aminoácidos na cadeia protéica (Bunn e Forget, 1986). Como exemplo clássico, podem-se citar as Hemoglobinas (Hb) S ($\alpha_2\beta_2^{6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}}$) e C ($\alpha_2\beta_2^{6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}}$), ambas variantes de cadeias β (Dacie e Lewis, 1995).

Já as talassemias são ocasionadas pela redução ou ausência de síntese das cadeias, levando ao acúmulo daquela cadeia cuja produção está preservada. As cadeias acumuladas precipitam e acabam por lesar a membrana das hemácias, levando à destruição prematura dos eritrócitos. As talassemias mais conhecidas são as α e β , pela frequência e manifestações clínicas de considerável importância nos portadores, já que as cadeias α e β formam a hemoglobina A (Bunn e Forget, 1986; Higgs, 1993).

As talassemias β (β tal) são um grupo de alterações moleculares causadas por redução parcial ou completa da síntese de uma ou mais cadeias de globina β , levando a uma menor produção de hemoglobina, originando desta forma anemia de graus variados, de característica microcítica e hipocrômica (Weatherall e Clegg, 1981). Mutações no gene da globina β em heterozigose levam, com raras exceções, a uma anemia leve e assintomática denominada talassemia β menor. Mutações em homozigose, dependendo do grau de impedimento da síntese de globina, podem provocar anemia sintomática moderada (talassemia β intermediária), que pode exigir transfusões de eritrócitos apenas esporadicamente; ou formas graves (talassemia β maior) que são sintomáticas e exigem regime transfusional mensal, na maioria dos casos. Mutações no gene da globina β que suprimem totalmente a síntese são chamadas de Beta Zero (β^0). Mutações em que existe alguma síntese de cadeia de globina β são chamadas de Beta Mais (β^+) (Thein, 1998).

1.1- Formas clínicas da talassemia beta

O diagnóstico da talassemia β é realizado a partir de dados clínicos, laboratoriais e moleculares, é embasado fundamentalmente na gravidade da anemia que se apresenta

microcítica e hipocrômica nas três formas de talassemias β : menor, intermediária e maior (Cao et al., 1997).

Talassemia β menor: também denominado traço talassêmico, são heterozigotos clinicamente assintomáticos e habitualmente não necessitam de tratamento apesar de apresentar microcitose, hipocromia e níveis de hemoglobina levemente abaixo dos níveis normais. Embora o defeito possa ser detectado por exames laboratoriais específicos, é freqüentemente confundida com anemia por carência de ferro (Zago, 2004).

Talassemia β intermediária: essa denominação reserva-se para casos sintomáticos que espontaneamente mantêm níveis de hemoglobina de 6-9 g/dl, que não dependem de transfusões regulares (Zago, 2004).

Talassemia β maior: é resultante de homozigose ou heterozigose composta para os genes da globina β , e corresponde à forma mais grave da doença, dependente de transfusão, com quadro clínico composto de anemia intensa, esplenomegalia, deformidades ósseas e graves alterações no crescimento, no desenvolvimento e na reprodução. As manifestações surgem durante o primeiro ano de vida com menor aumento de peso, episódios de febre, diarréia, apatia, irritabilidade e palidez (Weatherall e Clegg, 1981). A maioria dos pacientes necessita de transfusões regulares, a cada 3 ou 4 semanas, seguidas de um regime de quelação do excesso de ferro. Este regime de transfusão/quelação deve ser iniciado o mais precocemente possível, para evitar deformidades ósseas e danos ao pâncreas, fígado, miocárdio e outros órgãos (Cappellini, 2000).

No passado, o quadro da talassemia maior era um reflexo direto da falta de um regime transfusional regular, como também de uma quelação regular do excesso de ferro. Na ausência de tratamento, o quadro clínico se agrava progressivamente e a morte ocorre geralmente na primeira década de vida. Há anemia intensa (Hb < 6,0g/dl), esplenomegalia volumosa, atraso do crescimento, redução da massa muscular e alterações craniofaciais características (Cappellini, 2000).

A definição entre talassemia maior ou intermediária é fundamental na prática clínica, pois define o tipo de tratamento que o paciente receberá. No entanto, essa distinção nem sempre é fácil, uma vez que o quadro clínico pode ser resultante de grande número de combinações moleculares (Weatherall, 1990).

1.2- Incidência da Talassemia β

Calcula-se que no mundo todo, 15 milhões de pessoas tenham talassemia (OMS). A partir de 1885 a talassemia β foi introduzida em nosso meio, principalmente pelos maciços contingentes de imigrantes italianos que se estabeleceram no Sul e no Sudeste do Brasil.

Na região de Ribeirão Preto–SP, um estudo realizado por Zago et al. (1983) avaliando 400 crianças em idade escolar, 602 mães e 606 recém-nascidos, revelou a presença de 0,8% (13 casos) de heterozigotos para talassemia β . Em estudo de rastreamento para hemoglobinopatias realizado em Campinas-SP e região, publicado por Ramalho et al. (1999) analisando 13.670 indivíduos subdivididos em: 9.196 doadores de sangue, 2.209 gestantes e 2.074 universitários, observou-se a presença de 1,3% (178) de traço talassêmico β . Um rastreamento para hemoglobinopatias realizado pelo Laboratório Municipal de Saúde Pública do Recife – PE, analisando 12.173 amostras (maioria de gestantes) no período de novembro 2002 a dezembro 2004, encontrou a presença de 0,68% de talassemia beta menor (Almeida et al., 2005).

No Brasil, segundo dados compilados pela Associação Brasileira de Talassemia (ABRASTA), foram notificados 557 casos de talassemia β , sendo 265 casos de talassemia β maior, 134 casos de talassemia β intermediária, além de 158 casos que apresentaram a interação anemia falciforme / talassemia β (S/ β tal).

A região Sudeste apresenta 324 casos da talassemia β maior e intermediária, totalizando 67,0% dos casos observados no Brasil. O estado de São Paulo é o local onde há a maior concentração da doença no Brasil: 150 casos de talassemia maior e 54 de talassemia intermediária, perfazendo um total de 51,1% (204) de todos os casos notificados no país. O Nordeste é a segunda região do Brasil com casos de talassemia β maior e intermediária, (72 casos, correspondendo a 18,0%). Destaca-se nesta região o estado de Pernambuco por apresentar 55 casos da doença talassêmica (13,7%): 14 talassemia maior e 41 talassemia intermediária (ABRASTA).

1.3- Interação S/ β talassemia

A doença falciforme (SS, SC e S/ β tal) tem ampla distribuição mundial e é um problema de saúde pública no Brasil, com prevalência de 0,1 a 0,3% da população

negróide, com tendência a acometer parcela cada vez mais significativa da população devido ao alto grau de miscigenação em nosso país (Ramalho et al., 1996). As regiões onde a condição, tanto de portador quanto de doente é mais prevalente, são o sudeste e o nordeste. Bandeira et al. (1999) encontraram a frequência de 5,3% para os heterozigotos AS e de 0,2% para doença falciforme numa população de recém-nascidos atendidos no Instituto Materno Infantil de Pernambuco. Com a implantação do teste de triagem neonatal para hemoglobinopatias, foi possível calcular a proporção de nascidos vivos com o traço falciforme no estado de Pernambuco que é de 1:21, enquanto a proporção de diagnosticados com doença falciforme é de 1:1400 (Ministério da Saúde, 2006).

As doenças falciformes representam as mais frequentes alterações hereditárias das hemoglobinas no Brasil (Costa, 2004). Uma outra possibilidade de ocorrência de genes talassêmicos é na doença falciforme em que o gene da Hb S está associado ao da talassemia β , produzindo o que se chama de S/ β talassemia. A interação S/ β -talassemia é uma das variantes mais frequentes, ocorrendo em 1 a cada 8.000 mil nascimentos em Pernambuco. Possíveis combinações do gene da HbS com genes talassêmicos podem resultar em S/ β^+ ou S/ β^0 talassemia. Tais composições moleculares costumam resultar em formas clínicas menos graves de doença falciforme (Zago et al., 1980). Essa condição, clínica e geneticamente heterogênea, resulta em quantidades variáveis de HbS, HbF e HbA, dependendo da mutação talassêmica associada (Weatherall e Clegg, 1981).

1.4- Bases moleculares da talassemia β

Os genes responsáveis pela síntese de cadeias da β globina e similares estão organizados num agrupamento ou *cluster*, localizado no braço curto do cromossomo 11 que contém 5 genes funcionais (5'- ϵ - γ^G - γ^A - ϕ β - δ - β -3'), organizados na ordem de suas expressões durante o desenvolvimento do embrião e feto (Thein, 1998).

Quase 200 alelos de talassemia β foram caracterizados. Destes, 125 representam mutações pontuais em regiões funcionalmente importantes do gene, causadas por uma variedade de mecanismos (Figura 1) ou em seqüências flaqueadoras do gene (Thein, 1998).

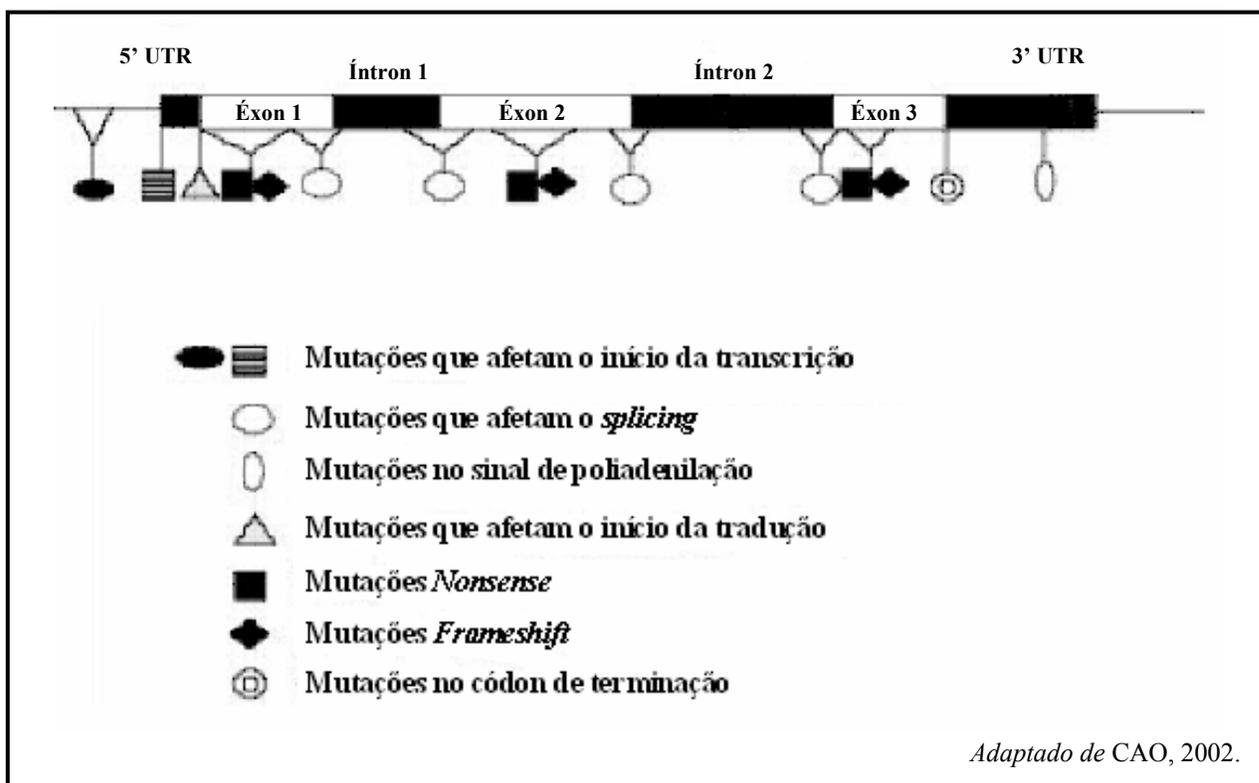


Figura 1: Diferentes mecanismos moleculares que causam talassemia β .

Mutações nas regiões reguladoras (*CAT box* e *TATA box*) que antecedem aos genes, diminuem a eficiência da transcrição do RNA mensageiro (RNA_m) por diminuírem a ligação a fatores transcricionais, originando assim talassemias do tipo β^+ .

Mutações no sinal de poliadenilação dificultam a adição da cauda poli A ao RNA_m que se torna assim mais instável. Esses transcritos alongados de cadeia β são instáveis, mas a maior parte dos transcritos produzidos são normais. Essas mutações geralmente levam a um fenótipo de talassemia β^+ leve (Forget, 2001; Thein, 1998).

Aproximadamente a metade dos alelos beta talassêmicos produz talassemias β^0 . Muitos são *frameshifts*, ou seja, alteração na fase de leitura provocados pela inserção ou deleção de um único nucleotídeo na região codificante do gene beta. Essas mutações destroem a leitura normal e interferem na tradução do RNA_m pela introdução de um códon de terminação prematura. Outras são mutações chamadas de *nonsense*, isto é, substituição de bases que introduzem também um códon de terminação prematura. Cadeias globinicas

truncadas podem ser produzidas como resultado de tais mutações, mas elas não são usualmente detectadas, presumivelmente porque são muito instáveis e rapidamente degradadas, originando o fenótipo de talassemia β^0 (Thein, 1998; Forget, 2001).

As mutações que afetam o processamento do RNA talvez sejam as de maior interesse funcional. O RNA inicialmente transcrito contém éxons e íntrons. A perda dos íntrons é essencial para formar um RNA funcional. Mutações nas uniões éxon-íntron (ou próximas a elas) impedem ou dificultam a retirada do íntron, originando talassemia β^0 ou β^+ , respectivamente. De fato, a análise desses genes β talassêmicos tem proporcionado minuciosa reflexão acerca das seqüências de RNA requeridas para um *splicing* de RNA específico e eficiente. Mutações que afetam os invariáveis dinucleotídeos GT na extremidade 5' (doadora) e na AG na extremidade 3' (receptora), suprimem o *splicing* normal e produzem talassemia do tipo β^0 , onde nenhum RNAm é encontrado. Como exemplo podemos citar a mutação mediterrânea IVS-I-1 resultante da troca de G→A no primeiro nucleotídeo do primeiro íntron que impede o processamento do RNA para retirar o íntron, impedindo a síntese de cadeias β (Zago, 2004; Forget, 2001).

Ao lado desses invariáveis dinucleotídeos existem seqüências que estão bem conservadas e uma certa leitura consensual pode ser reconhecida. Mutações que ocorrem nessas seqüências reduzem a eficácia do *splicing* em vários graus e produzem fenótipos de talassemia que variam de leves a graves. Por exemplo, a mutação na posição 5 do íntron I (IVS-I-5 - G→C, T ou A) produz uma talassemia β^+ grave, enquanto que a substituição T→C no nucleotídeo seguinte, IVS-I posição 6, produz uma talassemia β^+ leve (Treisman et al., 1983). Esta última é geralmente citada como a forma portuguesa de talassemia (Tamagnini et al., 1983) e faz parte da maioria das mutações leves encontradas em talassêmicos do Mediterrâneo (Thein, 1998). Os indivíduos homocigotos IVS-I-6/IVS-I-6, em geral têm quadro clínico, ou expressão fenotípica, compatível com a talassemia intermediária (Costa et al., 1991).

Algumas mutações no íntron ou na região codificante podem trazer um efeito inverso, criando um sítio alternativo de *splicing*. Cada molécula de RNA poderá então ser processada pela via normal (RNAm funcional) ou alternativamente pela via anômala (RNAm não funcional). Estas mutações são causadoras de talassemia β^+ , e a quantidade de cadeias β produzida dependerá da proporção de moléculas de RNAm processadas pela via normal.

Um exemplo desse tipo de mutação é a substituição de A→G na posição 110 do íntron 1, que produz uma forma grave de talassemia β^+ , pois apenas 10-20% do RNA_m são processados pela via normal. Essa mutação é uma das maiores causas de talassemia β^+ no Mediterrâneo (Zago, 2004; Forget, 2001).

A mutação IVS-I-6 (T→C) é de particular interesse ao nosso estudo, uma vez que a constituição étnica do povo pernambucano também é baseada no povo português, supondo-se ademais que os poucos imigrantes que chegaram a Pernambuco desde o início do seu povoamento, pouco afetaram a formação básica do seu povo (Freyre, 1992). Além disso, não se tem encontrado, até agora, indícios da existência de hemoglobinopatias na América pré-colombiana (Varella et al., 1996), o que nos indica que as talassemias foram trazidas ao Brasil pelas diversas correntes migratórias, européias, asiáticas e africanas. Estudos realizados na população portuguesa revelaram que as quatro mutações genéticas mais prevalentes foram códon 39(C→T) 39%, IVS-I-1 (G→A) 26%, IVS-I-110 (G→A) 17% e IVS-I-6 (T→C) 15% (Faustino et al., 1992).

Uma vez que o grupo étnico indígena não contribuiu com mutações β talassêmicas, seria natural esperar que as mutações acima descritas sejam também freqüentes entre os talassêmicos brasileiros de origem portuguesa. Resta saber a contribuição dos africanos e de outros imigrantes na constituição do quadro molecular das talassemias no Brasil.

1.5- Talassemia β Intermediária

Uma forma de talassemia β é clinicamente definida como intermediária, quando se revela como uma anemia crônica moderada com níveis de hemoglobina entre 6 e 9g/dl, que se mantém espontaneamente sem necessidade transfusional contínua e na presença de esplenomegalia. Geralmente, o início dos sintomas e o reconhecimento da anemia ocorrem mais tardiamente, em geral, após o segundo ano de vida (Weatherall, 1990). Portanto, a definição de talassemia intermediária subentende um diagnóstico clínico que envolve um amplo espectro de fenótipos em dois extremos, em que se distingue desde formas leves até formas graves. Formas leves podem permanecer assintomáticas e bem toleradas até a idade adulta quando, geralmente, se apresentam com marcada hepatoesplenomegalia e sinais de hiperesplenismo (Ho et al., 1998).

Entre os dois extremos da talassemia intermediária coloca-se um espectro de quadros clínicos de gravidade variável, que parecem depender basicamente de um mecanismo principal que é a eritropoese ineficaz, que por sua vez é fruto do desequilíbrio da síntese de globinas α e β (Ho et al., 1998).

Baseado nesse pressuposto fisiopatológico há uma tendência imediata em se pensar que um fenótipo intermediário seja ligado a vários genótipos talassêmicos. Nos últimos anos, com aquisição de conhecimentos moleculares, foram feitas várias tentativas de relacionar manifestações clínicas com mutações e outros arranjos moleculares que pudessem, de alguma forma, traduzirem-se na expressão do fenótipo (Ho et al., 1998). É o caso de certas mutações leves no gene β globínico (β^+ ou β^{++}) que se caracterizam por uma menor redução na síntese de globina β levando, conseqüentemente, a uma menor quantidade de cadeias α livres. Os exemplos que com maior freqüência estão relacionados com quadros de talassemia intermediária são as mutações -101 (C \rightarrow T), -87 (C \rightarrow T), -88 (C \rightarrow T), -29 (A \rightarrow G) e a IVS-I-6 (T \rightarrow C) (Forget, 2001).

A caracterização clínico-laboratorial da talassemia β intermediária é freqüentemente dificultada pela grande variabilidade da sintomatologia e dos dados hematológicos dos pacientes. A correlação entre a apresentação clínica e as mutações tem sido uma dificuldade para vários pesquisadores (Cao et al., 1994). Por outro lado, a talassemia intermediária é uma forma clínica de menor gravidade que a talassemia maior, que resulta geralmente da combinação dos seguintes defeitos genéticos:

- Homozigose para genes β^+ talassêmicos de menor gravidade (como IVS-I-6);
- Combinação do gene β talassêmico grave com talassemia β^+ particularmente benigna (como β talassemia “silenciosa”);
- Associação de $\delta\beta$ com β^+ talassemia;
- Presença de um defeito adicional que reduz o excesso de cadeias α (como a co-herança de talassemia α) ou que aumenta a produção de cadeias γ (PHHF);
- Heterozigose para gene talassêmico β particularmente grave. Em geral, o heterozigoto β talassêmico é assintomático, mas raramente o defeito é suficientemente grave para determinar manifestações clínicas;
- Heterozigose para gene talassêmico β com genes α extras;

- Talassemia β dominante (variantes de cadeia β hiperinstável).

Zago (2004), Thein (2005) e outros observaram considerável variação nos fenótipos clínicos resultantes dessas interações moleculares.

1.6- Fisiopatologia da talassemia β intermediária

As complicações clínicas da talassemia intermediária são decorrentes de três processos principais: eritropoese ineficaz, anemia crônica e sobrecarga de ferro. A gravidade clínica depende primariamente do defeito molecular no gene β . A diminuição da síntese de cadeias β leva a um desequilíbrio com as cadeias alfa. Excessos de cadeias alfa são extremamente instáveis e precipitam nos precursores eritroídes da medula óssea, formando corpos de inclusão, que causam danos à membrana e morte celular, levando à eritropoese ineficaz (Olivieri, 1999). É importante enfatizar que, quanto menor for o desequilíbrio da síntese das globinas, menor será a taxa de globinas α livres que precipitam dentro da hemácia e, conseqüentemente, menor será a taxa de eritropoese ineficaz, o grau de anemia e suas complicações clínicas (Cappellini, 2000). A eritropoese leva a uma tal expansão medular, que ocupa a matriz óssea e provoca osteoporose e deformidades ósseas. O estresse eritropoético a que a medula é constantemente imposta pode determinar compressão por massas eritropoéticas em vários locais, prevalentemente intravertebrais, mas também no fígado ou intra-raqueanas (Camashella e Cappellini, 1995). O nível de eritropoese ineficaz é o determinante primário no desenvolvimento da anemia. A anemia crônica leva a um aumento da absorção gastrointestinal de ferro, resultando em sobrecarga de ferro, que pode ser a causa de várias complicações sérias, incluindo cardiopatia e anormalidades endócrinas, tais como diabetes mérito e hipogonadismo (Taher et al., 2006).

1.7- Fatores moduladores de gravidade na talassemia β

A notável diversidade fenotípica das talassemias β é protótipo de como o amplo espectro na gravidade da doença pode ser gerado, e está diretamente relacionada ao desequilíbrio na produção das cadeias globínicas α e β . Muitas das variações podem ser explicadas pela heterogeneidade das lesões moleculares que afetam o gene da globina β , e que podem ser influenciadas por outros determinantes genéticos ligados ou não aos genes globínicos (Thein, 2004).

A capacidade de prever o fenótipo a partir do genótipo tem importantes implicações clínicas, na triagem de portadores da talassemia β , no aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal, e no planejamento de um regime de tratamento apropriado. A análise do genótipo torna-se importante para se estabelecer o diagnóstico precoce de uma talassemia β^+ leve. O conhecimento da diversidade fenotípica da talassemia β tem avançado com análises das bases moleculares das formas de talassemia β e análises da relação genótipo/fenótipo na talassemia intermediária (Thein, 2004). Entretanto, prever fenótipo pelo genótipo na talassemia intermediária é ainda difícil devido a fatores moduladores genéticos e ambientais (Weatherall, 2001).

Os modificadores genéticos primários são os diferentes alelos de talassemia β que causam completa ou marcada redução na síntese de cadeias β . Modificadores secundários são aqueles que têm um efeito direto no excedente de cadeias alfa, tais como: genótipo α globínico e determinantes genéticos que aumentam a produção de cadeias γ . Modificadores terciários são polimorfismos que ocorrem fora do *cluster* α e β , que envolvem osso, ferro, metabolismo da bilirrubina, entre outros e que podem influenciar na expressão clínica da doença. Os fatores ambientais incluem: condições sociais, nutrição e a disponibilidade de cuidados médicos (Thein, 2004; Forget, 2001; Cao, 2002; Taher et al., 2006, Galanello e Cao, 1998).

1.7.1- Mutação β talassêmica

Com exceção de poucas deleções, a grande maioria das talassemias β é causada por mutações de ponto no gene ou em suas regiões flangeadoras, e podem afetar qualquer nível da regulação gênica (Thein, 2004). O fator genotípico mais consistente que pode ser usado na predição do fenótipo é o tipo de alelo β talassêmico (Ho et al., 1998; Weatherall, 2001; Cao, 2002, Thein, 2005).

1.7.2- Genótipo α

Em muitas populações em que a talassemia β é prevalente, a talassemia α também ocorre com alta frequência, e por isso não é incomum a co-herança de ambas as condições. Homozigotos ou heterozigotos compostos para talassemia β com co-herança com

talassemia α levam à uma redução do excesso de cadeias α e menor formação de corpos de inclusão nos precursores eritróides, e com isso tendem a ter uma condição menos grave (Thein, 2005; Galanello e Cao, 1998). Assim como as talassemias β , as diferentes talassemias α que predominam em diferentes grupos raciais exibem uma ampla variação de gravidade. Essa interação proporciona bases para uma considerável heterogeneidade clínica; os níveis de melhora dependem da gravidade do alelo β talassêmico e do número de genes α funcionais (Thein, 2005). Em homozigotos para talassemia β^+ , que tem alguma produção de cadeias β , mesmo uma única deleção ($-\alpha/\alpha$) é capaz de melhorar o quadro clínico. Homozigotos β^0 podem ter um efeito benéfico pela co-herança de duas deleções ($-\alpha/-\alpha$) ou ($--/\alpha\alpha$) ou de um defeito não-delecional no gene α_2 .

Entretanto, tendo em vista que cada combinação pode estar associada à uma ampla variação na apresentação clínica, a definição do genótipo α globínico em um único paciente pode não ter um valor absoluto na predição do fenótipo clínico (Galanello e Cao, 1998; Thein, 2005).

Em heterozigotos para talassemia β , a co-herança de talassemia α normaliza a microcitose e hipocromia, enquanto a presença de genes α extras aumenta o desequilíbrio, podendo converter um estado tipicamente assintomático para uma talassemia intermediária. Na maioria dos casos, isso é relatado pela co-herança de genes α globínicos triplicados. Genes α triplicados ($\alpha\alpha\alpha$) ocorrem com baixa frequência em muitas populações. A co-herança de dois genes α extras ($\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ou $\alpha\alpha\alpha/\alpha$) com heterozigotos para talassemia β resulta em talassemia intermediária. Entretanto, o fenótipo de um gene α extra ($\alpha\alpha\alpha/\alpha$) com heterozigotos para talassemia β é muito variável e depende da gravidade do alelo da talassemia β (Thein, 2005).

1.8- Talassemia alfa na doença falciforme

Alguns estudos demonstraram que portadores da anemia falciforme e de deleção dos genes α possuem sobrevida maior que os indivíduos com genes α normais, indicando que esta associação favorece o curso clínico menos grave da doença. O efeito protetor da talassemia α na anemia falciforme é possivelmente devido à redução da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (Mears et al., 1983; Nagel e Steinberg, 2001).

Estes indivíduos também apresentam volume corpuscular médio (VCM) diminuído, hemoglobina, hematócrito (Ht) e número de hemácias (Hm) aumentados, com redução do número de reticulócitos (Adams et al., 1994). O mecanismo de proteção desencadeado pela talassemia α está provavelmente associado ao aumento da relação superfície / volume celular, com redução das lesões da membrana eritrocitária, provenientes da perda de cátions e desidratação celular. As células mais hidratadas e com concentração intra-eritrocitária reduzida de HbS apresentam concentração corpuscular média diminuída, com conseqüente retardo da polimerização da HbS desoxigenada (Steinberg e Embury, 1986; Weatherall, 1990).

A deleção do gene α parece ter um efeito protetor contra AVC em crianças com HbSS. Adicionalmente a triplicação dos genes α parece ser um fator de risco no desenvolvimento de AVC em pacientes Hb SS (Sarnaik e Ballas, 2001). Aparentemente, a talassemia α também diminui o risco de falência maior de órgãos e aumenta o risco de osteonecrose.

Os benefícios na evolução clínica que essas alterações podem produzir, principalmente a redução na concentração da hemoglobina intracelular, ainda não estão completamente estabelecidos. Aparentemente úlceras de perna, acidente vascular cerebral e anormalidades na retina são menos freqüentes em pacientes com alfa talassemia, embora alguns estudos apontem que estes pacientes poderiam apresentar mais episódios dolorosos devido ao aumento da viscosidade sangüínea correspondente ao aumento da hemoglobina (Costa, 2004).

1.9-Variação na produção de Hb Fetal

O aumento da produção de cadeias γ tem um efeito benéfico no quadro clínico de homozigotos para talassemia β , não apenas por reduzir o desequilíbrio α / não α , mas também por produzir um aumento na síntese de Hb total. Vários determinantes genéticos, associados com o aumento na produção de HbF foram identificados (Galanello e Cao, 1998).

Em todas as talassemias β , os níveis de Hb Fetal são aumentados devido à sobrevivência seletiva dos precursores eritróides que relativamente sintetizam mais cadeias γ . Entretanto, pacientes com talassemia β diferem consideravelmente em suas capacidades

de sintetizar cadeias γ e sua resposta à Hb Fetal. Isso se tornou evidente em um determinado grupo de pacientes homocigotos β^0 que têm uma doença leve, apesar da ausência de HbA. Esses pacientes parecem ter uma capacidade herdada de produzir Hb Fetal e são capazes de manter um nível razoável de hemoglobina (Thein, 2005).

Determinantes genéticos que influenciam a produção de Hb Fetal podem estar ligados ou não ao complexo da globina β . Um terço dessa variação genética é resultado de uma alteração de C \rightarrow T na posição -158 do gene γ^G , também conhecido como polimorfismo Xmn I. Esse sítio XmnI é comum em todos os grupos populacionais e está presente em uma frequência de 32 a 35%. Embora o aumento nos níveis de Hb Fetal seja mínimo na população normal, estudos clínicos têm mostrado que, sob condições de estresse hematopoético, por exemplo em homocigotos para talassemia β e na doença falciforme, a presença desse polimorfismo favorece o aumento na produção de Hb Fetal. Isso pode explicar porque algumas mutações ligadas a diferentes haplótipos (com a presença ou ausência do polimorfismo Xmn I) estão associadas com gravidades clínicas diferentes (Thein, 2004).

1.10- Haplótipos β^{Tal}

O tipo de variabilidade mais comum no complexo gênico das globinas α ou β é aquele produzido por polimorfismos em determinadas seqüências. Estas alterações ocorrem aproximadamente a cada cem bases ao longo do genoma. O padrão de combinação dos sítios polimórficos para qualquer cromossomo é chamado de haplótipo. Dessa maneira, pode-se dizer que uma mutação, presente em indivíduos aparentemente não relacionados, tem a mesma origem se ao realizar um estudo de haplótipos, o haplótipo relacionado com a mutação em dos indivíduos é igual ao relacionado com a mutação em outro indivíduo (Antonarakis et al., 1984).

Os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β são definidos como uma associação não randômica da combinação de vários polimorfismos localizados ao longo do *cluster*, e podem ser empregados para caracterizar cromossomos associados com talassemia β . Em outras palavras, haplótipos podem refletir a presença de alelos específicos de talassemia β numa população. Vários tipos de mutações de talassemia β podem ser

encontrados em cada tipo de cromossomo, indicando a relação entre haplótipos e mutações específicas (Orkin et al., 1982).

1.11- Haplótipos β^S

Os diversos polimorfismos do DNA em *cis* ligados ao complexo da globina β definem os chamados haplótipos da anemia falciforme (Costa, 2004). A descoberta dos haplótipos do gene β^S apresentou-se como importante elemento de análise antropológica para estudo das composições populacionais, bem como elemento de estudo clínico, que pode fornecer dados preditivos acerca da evolução da doença e de seu nível de gravidade (Powars, 1991).

A mesma mutação β^S apareceu independentemente em pelo menos cinco diferentes grupos populacionais (Costa, 2004). Os haplótipos β^S têm sido associados a cinco diferentes haplótipos, de acordo com a região de origem e onde predominam: o haplótipo Benin tem sido associado à África Ocidental; o Bantu ou República Africana (CAR) à África Oriental Centro-Sul; o Senegal à África Atlântico Ocidental, o Índia-Arábia Saudita (Saudi) à Índia e Península Arábica Oriental e um menos freqüente, o Camarões (Cam), que é restrito na África ao grupo étnico Eton na Costa Ocidental Africana (Pagnier et al., 1984; Nagel, 1984; Sutton et al., 1989, Lapouméroutie et al., 1992). Estes haplótipos também estão associados a um quadro clínico e níveis de HbF variados, sendo que o haplótipo Senegal está associado a níveis elevados de HbF (>15%) e curso clínico menos grave da doença; o Benin a níveis medianos de HbF (5 a 15%) e curso clínico intermediário e o CAR a níveis diminuídos de HbF (< 5%) e quadro clínico mais grave. Os portadores do haplótipo Saudi apresentam níveis elevados de HbF e curso clínico heterogêneo (Nagel, 1984; Powars, 1991, Rahgozar et al., 2000).

1.12- Modificadores não-globínicos na talassemia β

Com o aumento da expectativa de vida dos pacientes com talassemia β , algumas variações no fenótipo, com atenção para algumas das complicações, têm se tornado aparentes e evidências sugerem que elas podem ser afetadas por variantes genéticas (Thein, 2004).

Adicionalmente à variação no fenótipo resultante da heterogeneidade do alelo talassêmico β ou do efeito de determinantes nos genes α e γ globínicos, o fenótipo da talassemia β também pode ser modificado pela ação de fatores genéticos não ligados ao *cluster* do gene da globina β . Dentre esses fatores, os mais conhecidos são os que afetam o metabolismo da bilirrubina, ferro e osso (Weatherall, 2001; Cao, 2002). O mais reconhecido fator modulador pertencente a essa categoria é a co-herança com determinantes da Síndrome de Gilbert (Cao, 2002; Thein, 2005).

Homozigotos para talassemia β que manifestam tanto uma forma dependente de transfusão como um quadro clínico mais leve, não dependente de transfusão, mostram uma marcante variação nos níveis séricos de bilirrubina não conjugada. A propensão a formar cálculos biliares por hiperbilirrubinemia é uma complicação comum às anemias hemolíticas (Galanello et al., 2001; Premawardhena et al., 2001; Charr et al., 2005; Fertin et al., 2003). Essa variação pode ser devida à taxa de destruição de hemácias transfundidas, à eritropoese ineficaz, à hemólise, ou à capacidade de eliminação que parcialmente depende da atividade de glucuronização da bilirrubina (Bosma et al., 1995).

A síndrome de Gilbert, uma forma crônica e leve de hiperbilirrubinemia não conjugada, é causada por uma diminuição da atividade enzimática da UDP-glucuronosil transferase 1 (UGT1). As bases moleculares dessa síndrome geralmente consistem na inserção de um dinucleotídeo adicional (TA) na configuração $A(TA)_nTAA$ da região promotora no gene UGT1 A1. Essa configuração pode variar no comprimento, onde o “n” representa um número diferente de repetições TA. Indivíduos normais usualmente possuem o alelo $A(TA)_6TAA$. A homozigose $A(TA)_7TAA / A(TA)_7TAA$ está envolvida na síndrome de Gilbert (Bosma et al., 1995; Monaghan et al., 1996; Aono et al., 1995). Em muitos pacientes com talassemia β homozigota e doença de células falciformes, observa-se uma considerável variação nos níveis séricos de bilirrubina. Vários estudos mostram que pacientes com síndromes talassêmicas e homozigotos $(TA)_7$ são mais propensos a desenvolver colelitíase (Galanello et al., 2001; Premawardhena et al., 2001; Charr et al., 2005; Kalotychou et al., 2003).

Considerando que pacientes com síndromes talassêmicas apresentam muitas vezes quadros clínicos variados que dificultam a tomada de decisão terapêutica e de cuidados de

saúde em geral, a identificação de padrões biológicos, que influenciem na modulação fenotípica, é muito útil e de grande impacto na melhoria da sobrevida e da qualidade de vida dos doentes.

Objetivos

Objetivo Geral

- Caracterizar as síndromes talassêmicas em população do estado de Pernambuco, do ponto de vista clínico, bioquímico e molecular.

Objetivos Específicos

- Caracterizar pacientes homozigotos para a mutação β^+ IVS-I-6 (T→C);
- Comparar a evolução clínica e laboratorial de 2 grupos de pacientes com doença falciforme (HbS/ β talassemia) com diferentes genótipos e que apresentavam quantidades similares de HbS, mas com diferença evidente nas suas quantidades de HbF e HbA;
- Avaliar o efeito dos genótipos relacionados à Síndrome de Gilbert na evolução clínica dos pacientes.

Pacientes e Métodos

2.1- Casuística

Foram selecionados, no período de Junho/2004 à Junho/2006, 119 pacientes com Síndrome Talassêmica acompanhados regularmente no ambulatório de hemoglobinopatias do Hospital de Hematologia da Fundação HEMOPE, estado de Pernambuco. De acordo com os dados clínicos e laboratoriais e com o padrão estabelecido previamente (Guidelines for the clinical management of thalassemia - Thalassemia International Federation, 2000), 11 desses pacientes foram diagnosticados com talassemia β maior, 38 com talassemia β intermediária e 70 com a interação S/ β talassemia. Os pacientes com algum grau de parentesco foram excluídos.

Os pacientes com talassemia β maior e intermediária apresentavam idade média de 19,5 anos (6-83 anos); 25 (53,2%) do sexo feminino e 22 (46,8%) do sexo masculino; 3 (6,4%) negros, 5 (10,6%) pardos e 39 (83,0%) caucasianos. Para a interação S/ β talassemia, a idade média foi de 20,9 anos (2-56 anos); 36 (51,4%) do sexo feminino e 34 (48,6%) do sexo masculino; 4 (5,7%) negros, 22 (31,4%) caucasianos e 44 (62,8%) pardos.

A cada convocação ou durante as visitas de rotina, cerca de 8 ml de sangue foram coletados para análises laboratoriais. exceto para menores de cinco anos, cujo volume solicitado foi de 4ml. A atualização dos dados clínicos dos pacientes foi realizada a cada visita de rotina.

2.2- Aspectos Éticos da Pesquisa

Este projeto foi aprovado em 11/06/2004 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação HEMOPE/PE – (registro: 120604), de acordo com o previsto na resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Os pacientes e familiares, após informação, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), previamente aprovado pelo CEP.

2.3- Análise Hematológica, Bioquímica e Clínica

A classificação de talassemia β maior e intermediária foi feita segundo os procedimentos recomendados internacionalmente (Guidelines for the clinical management of thalassemia - Thalassemia International Federation, 2000). Enquanto os casos de interação S/ β talassemia foram diagnosticados levando-se em consideração a presença de

HbS na eletroforese alcalina em pH 8,6, teste de solubilidade positivo para Hb desoxigenada, VCM (volume corpuscular médio) \leq 80fl, morfologia das hemácias revelando microcitose e hipocromia, além do estudo familiar.

A quantificação das hemoglobinas A, A₂, Fetal e S foi feita por cromatografia líquida de alta performance (HPLC – VARIANT / BIO-RAD, CA, USA). As análises hematimétricas foram realizadas utilizando o contador eletrônico de células (Coulter T-890, Coulter Corporation, FL, USA) e para a contagem de reticulócitos utilizou-se à coloração supravital com o corante azul de crezil brilhante após 30 minutos de incubação a 37°C.

A determinação quantitativa da bilirrubina total e direta foi realizada em analisador automático (MODULAR ANALYTICS – Roche / Hitachi, Mannheim, Germany, utilizando teste imunoturbidimétrico.

2.4- Extração do DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada pela técnica de fenol-clorofórmio modificada.

O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos, o plasma descartado e os eritrócitos lisados com uma mistura de soluções contendo NH₄Cl 0,144M e NH₄HCO₃ 0,01M e após centrifugação o sobrenadante foi desprezado. A seguir, a solução denominada TKM1 (Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM; MgCl₂ 10mM; EDTA 20mM) foi adicionada ao precipitado juntamente com 100µl de Triton X-100. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos e posteriormente o sobrenadante foi descartado, obtendo-se dessa forma, o precipitado de leucócitos.

Para lisar os leucócitos, foram adicionados 400µl da solução TKM2 (Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM; MgCl₂ 10mM; NaCl 0,4 M; EDTA 20mM) e 25 µl de SDS 10% e incubado à 55°C durante 30 minutos. Após esse período, 180µl de NaCl 5M foram adicionados à solução anterior e mantida a temperatura ambiente por 20 minutos. A amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo, adicionando-se a ele, um volume igual de fenol e de uma solução clorofórmio/álcool isoamílico (proporção 24:1), seguido de homogeneização, centrifugação e transferência do sobrenadante para outro tubo. A mistura de clorofórmio/álcool isoamílico foi adicionada ao tubo, centrifugada e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, no

qual foram adicionados acetato de sódio 3M pH 5,3 e etanol absoluto gelado para precipitação do DNA, sendo então novamente centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos; o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” lavado com etanol 70% gelado. O DNA foi solubilizado em água deionizada e estéril, quantificado em equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) e a análise qualitativa realizada em gel de agarose 1,0%.

2.5- Reação de Amplificação (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), é uma técnica, *in vitro*, para amplificação de DNA. A reação, catalisada pela *Taq* polimerase, utiliza *primers* que hibridizam-se em fitas opostas de regiões específicas do genoma e flanqueiam a seqüência a ser amplificada. Os ciclos são séries repetidas de desnaturação do DNA, anelamento e extensão dos *primers*, resultando em um acúmulo exponencial do fragmento (Saiki, 1992).

Foram utilizadas técnicas específicas baseadas na PCR, de acordo os procedimentos diagnósticos.

2.6- Determinação dos Haplótipos β^S e β^{Tal} - PCR e Análise de Restrição

A determinação dos haplótipos foi realizada por PCR seguido de análise de restrição. Para os haplótipos β^S foram analisados 6 sítios polimórficos, segundo Sutton et al., 1989 (Figura 2); e para os haplótipos β^{Tal} foram analisados 6 sítios polimórficos, conforme Orkin et al., 1982 (Figura 3).

Para identificação dos haplótipos de pacientes com a interação S/ β talassemia (β^S/β^{Tal}) foram analisados 8 sítios polimórficos: 5' γ^G -*Xmn*I, γ^G -*Hind*III, γ^A -*Hind*III, $\psi\beta$ -*Hinc*II, 3' $\psi\beta$ -*Hinc*II, 5' β -*Hinf*I, β -*Ava* II e 3' *Bam*H I.

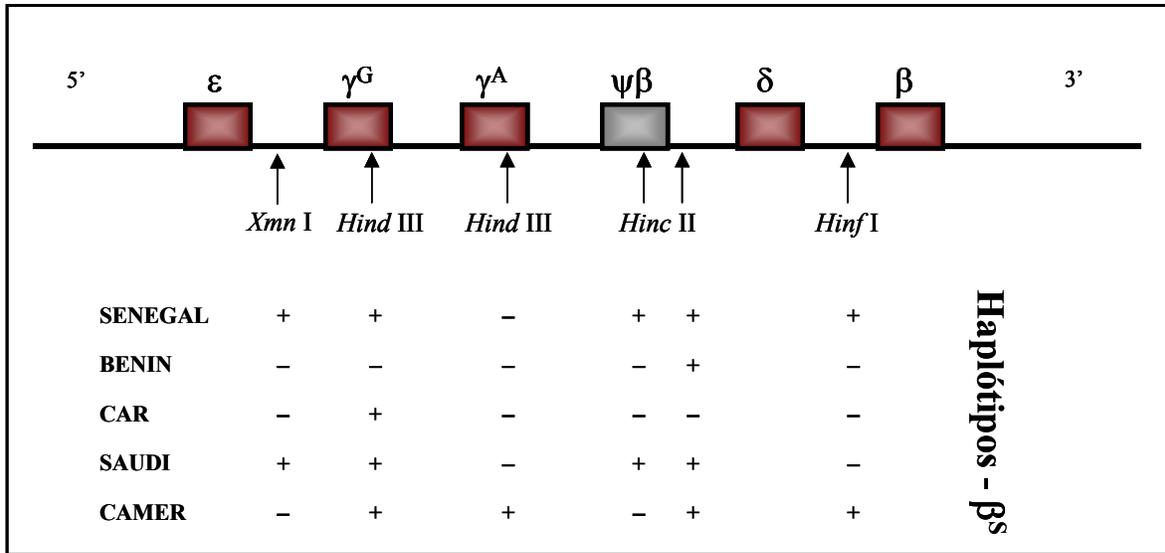


Figura 2: *Cluster* β mostrando os sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β^S segundo Sutton et al. (1989).

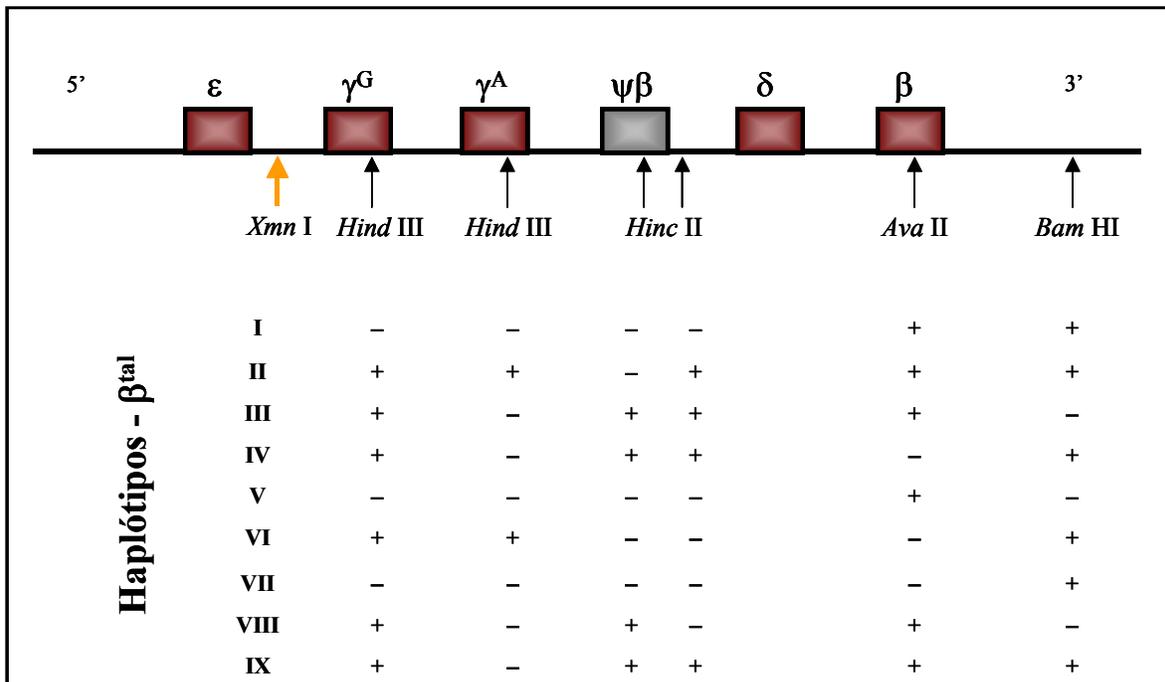


Figura 3: *Cluster* β mostrando os sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β^{tal} segundo Orkin et al. (1982). A seta em destaque (\rightarrow) indica o polimorfismo -158 (C \rightarrow T) 5' γ^G (Xmn I).

As seqüências dos “*primers*” para análise dos polimorfismos do *cluster* β foram descritas por Sutton et al. (1989) e *Miranda et al., (1997) . Estas seqüências estão listadas na Tabela 1

Tabela 1: *Primers* utilizados para amplificação de regiões do *cluster* β : localização referente ao *cluster* β no cromossomo 11 depositados no banco de dados NCBI (ID: U01317).

<i>Primer</i>	Seqüência do <i>Primer</i> (5'-3')	Direção	Posição	
H0	AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	→	33862	5' γ^G
H1	AGGAGCTTATTGATAACCTCAG	←	34518	
H2	AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	←	36203	γ^G
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	35422	
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	40358	γ^A
H4	TAAATGAGGAGCATGCACACAC	←	41119	
H5	GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	→	46426	$\psi\beta$
H6	ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	←	47126	
H7	TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	→	49476	3' $\psi\beta$
H8	GGACCCTAACTGATATAACTA	←	50089	
H9	CTACGCTGACCTCATAAATG	→	60906	5' β
H10	CTAATCTGCAAGAGTGTCT	←	61291	
*P1	TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG	→	61976	β
*P5	TCATTCGTCTGTTTCCCATTC	←	62746	
SF1	GCTCTACGGATGTGTGAGAT	→	71728	3' β
SF2	GCCCACATCACCAAGGCAAT	←	73248	

→: sense; ←: anti-sense.

A composição das reações e condições de amplificação variaram dependendo da região a ser amplificada, e estão representadas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2: Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do *cluster* da globina β .

Componentes	Volumes (μ l)					
	<i>Xmn</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Hinc</i> II	<i>Hinf</i> I	<i>Ava</i> II	<i>BamH</i> I
	5', γ^G	γ^G e γ^A	$\psi\beta$ e 3' $\psi\beta$	5' β	β	3' β
Tampão (10X)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
MgCl ₂ (50mM)	2,5	2,0	2,0	2,5	2,0	2,0
dNTP's (10mM)	1,0	1,5	1,5	1,0	1,0	1,0
Primer 5' (10 μ Ml)	1,25	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Primer 3' (10 μ M)	1,25	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U/ μ l)	0,25	0,5	0,5	0,25	0,3	0,3
DNA (200 ng)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
dH ₂ O	37,75	38,0	38,0	38,25	38,7	38,7
Volume Final (μl)	50	50	50	50	50	50

Tabela 3: Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do *cluster* da globina β .

Região	Desnaturação inicial		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão Final	
	35 ciclos									
	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo
5'γG	94	5'	94	45''	60	45''	72	1'30''	72	7'
ΓG	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
ΓA	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
ψβ	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
3'ψβ	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
5'β	94	5'	94	45''	57	45''	72	1'30''	72	7'
β	96	2'	96	30''	58	1'	72	1'	72	7'
3'β	96	2'	96	30''	58	1'	72	1'	72	7'

Para confirmação da amplificação o produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta, para posterior análise de restrição.

2.7- RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism (Análise de Restrição)

O produto da PCR foi digerido, a 37°C durante 24 horas, com endonucleases de restrição apropriadas para cada sítio polimórfico. A identificação dos padrões de restrição que determinam os haplótipos foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta.

Cada amostra foi marcada pela presença (+) ou ausência (-) dos sítios de restrição. Como controle foi utilizada amostra de um indivíduo heterozigoto para cada sítio

polimórfico. O tamanho dos produtos de amplificação e após clivagem, podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4: Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição.

<i>Primers</i>	Enzima	Região	Tamanho Fragmento	Fragmentos Após Clivagem
H0 e H1	<i>XmnI</i>	5'γ ^G	650 pb	450 pb + 200 pb
H2 e H3	<i>HindIII</i>	γ ^G	780 pb	430 pb + 340 pb + 10 pb
H3 e H4	<i>HindIII</i>	γ ^A	760 pb	400 pb + 360 pb
H5 e H6	<i>HincII</i>	ψβ	701 pb	360 pb + 340 pb + 1 pb
H7 e H8	<i>HincII</i>	3'ψβ	590 pb	470 pb + 120 pb
H9 e H10	<i>HinfI</i>	5'β	380 pb	240 pb + 140 pb
P1 e P5	<i>AvaII</i>	β	763 pb	446 pb + 214 pb + 103 pb
SF1 e SF2	<i>BamHI</i>	3'β	1520 pb	1228 pb + 292 pb

De acordo com perfil de restrição para as regiões polimórficas do *cluster* da globina β, é possível definir os haplótipos β^S (Figura 2) e β^{Tal} (Figura 3).

2.8- Detecção das Mutações β Talassêmicas - PCR e Seqüenciamento

As mutações da talassemia β envolveram a amplificação e o seqüenciamento direto do gene da globina β, utilizando *primers* específicos que flanqueiam o gene, realizado no equipamento MegaBACE 1000 (GE Healthcare - Amersham) e as deleções e inserções foram confirmadas por clonagem utilizando o Kit pGEM-T Easy Vector System I (PROMEGA), conforme recomendações do fabricante. A análise das fitas isoladas foi feita seqüenciamento direto do produto de PCR clonado.

As seqüências dos “*primers*” para análise do gene da globina β foram descritas por Miranda et al. (1997) e estão listadas na Tabela 5.

Tabela 5: *Primers* utilizados para amplificação do gene β : localização referente ao *cluster* β no cromossomo 11 (ID: U01317).

<i>Primers</i>	Seqüência do <i>Primer</i> (5'-3')	Direção	Posição	Fragmento
P1	TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG	→	61976	773 pb
P5	TCATTCGTCTGTTTCCCATTTC	←	62746	
β IVSII 5'	GTGAGTCTATGGGACCCTTG	→	62632	850 pb
β IVSII 3'	CTGTGGGAGGAAGATAAGAGG	←	63481	
58	AATCCAGCTACCATTCTGC	→	63369	430 pb
P7	GACCTCCCACATTCCCTTTTT	←	63798	

→: sense; ←: anti-sense.

2.9- Estratégia para rastreamento de mutações (Figura 4) na talassemia β

1. PCR com “*Primers*” P1 e P5 – Seqüenciamento com “*Primers*” β 1 e/ou P5; identificação das principais mutações encontradas em nossa população (IVSI-1, IVSI-5, IVSI-6, IVSI-110 e Cd39);
2. PCR com “*Primers*” P1 e P5 – Seqüenciamento com “*Primer*” 1R; identificação de mutações descritas na região promotora (-29, -87, -88, -101);
3. PCR com “*Primers*” 58 e P7 - Seqüenciamento com “*Primers*” 58 e/ou P7; identificação de mutações encontradas na região 3' UTR, éxon 3 e final do íntron 2 (IVSII-745, IVSII-849, Cd106/107 (+G), Cd121, Sítio de Poliadenilação);
4. PCR com “*Primers*” β IVSII-5' e β IVSII-3' - Seqüenciamento com “*Primers*” β IVSII-5' e/ou β IVSII-3'; identificação de mutações encontradas no íntron 2 (IVSII-654, IVSII-705, IVSII-745).

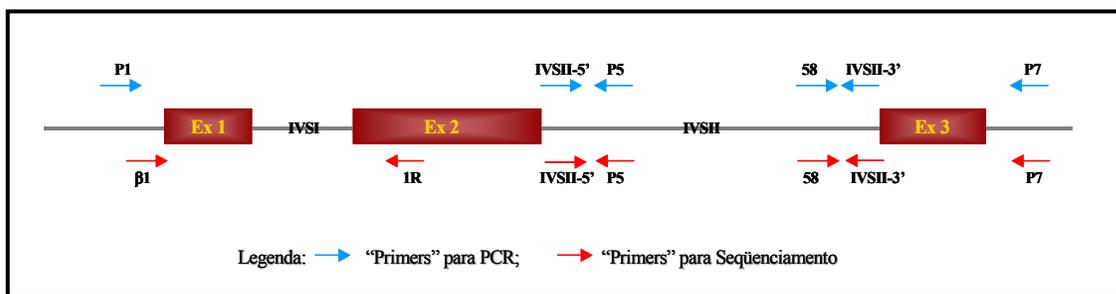


Figura 4: Esquema do Gene da Beta-Globina Humana – Cromossomo 11, com a estratégia para rastreamento de mutações na talassemia β . (Legenda - Ex: Éxon; IVS-I: Íntron I; IVS-II: Íntron II).

Na Tabela 6 estão citados outros *primers* utilizados apenas na reação de seqüenciamento para detecção das mutações no gene da globina β .

Tabela 6: *Primers* utilizados para seqüenciamento do gene β : localização referente ao *cluster* β no cromossomo 11 (ID: U01317).

<i>Primers</i>	Seqüência do <i>Primer</i> (5'-3')	Direção	Posição
β 1	TTTGCTTCTGACACAACTGT	→	62140
1R	CTACCCTTGGACCCAGAGGTTC	←	62442

→: sense; ←: anti-sense.

2.10- Seqüenciamento

O MegaBACE 1000, é um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia Amersham Biosciences. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase).

A amplificação para seqüenciamento automatizado foi realizada com o DYEnamic™ Terminator Cycle Sequencing Kit (MegaBACE™) (Amersham Pharmacia Biotech, Inc Cleveland, Ohio, USA). Para esta reação foi utilizado cerca de 30 ng do produto de PCR purificado, quantificado através de gel de agarose 1,5% utilizando um marcador de massa molecular (Low DNA Mass Ladder - Invitrogen), 5 μ M de *primer* sense ou antisense, 4 μ l da solução DYEnamic ET Reagent Premix e água deionizada estéril (volume final 15,0 μ l). A reação, distribuída em placa própria para seqüenciamento, foi protegida da luz com papel de alumínio. Em termociclador (GeneAmp® PCR System 9600 – Applied Biosystems), as amostras foram submetidas à desnaturação inicial de 96°C por 2 minutos seguido do ciclo:

- | | | |
|-----------------|---------------------|------------|
| • Desnaturação: | 96°C - 20 segundos | } 30 vezes |
| • Anelamento: | 57°C - 15 segundos; | |
| • Extensão: | 60°C - 1 minuto | |

Ao produto da reação de seqüenciamento foi adicionado 2,0 μ l de acetato de amônio 7,5M e 50,0 μ l de etanol absoluto para precipitação, seguido de incubação por 15

minutos em temperatura ambiente protegido da luz, e centrifugação a 4000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi removido por inversão. Foram adicionados 100,0 μ l de etanol 70% e posteriormente o material foi centrifugado a 4.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão para completa remoção do etanol. Para a eletroforese, foi adicionado em cada amostra, 10,0 μ l de loading buffer, uma mistura de formamida deionizada, 25mM EDTA (pH 8,0). As amostras foram homogeneizadas, aquecidas a 65°C por 3 minutos e submetidas à eletroforese em seqüenciador automatizado.

O gel para a eletroforese é o MegaBACE Long Read Matrix com poliacrilamida linear (LPAAs), as condições de eletroforese foram as seguintes: voltagem de injeção da amostra – 3 KV, tempo de injeção da amostra 80 segundos, voltagem de corrida – 9 KV, tempo de corrida 90 minutos, potência do Laser – 40 mW.

Após eletroforese, o Software MegaBACE analisou as seqüências e as amostras foram alinhadas e comparadas com a seqüência do gene da globina β , depositadas no banco de dados do NCBI (ID: U01317).

2.11- Genótipo α - Gap-PCR / PCR-Análise de restrição

A determinação do genótipo α foi realizada pelas técnicas Gap-PCR ou PCR seguido de análise de restrição.

Foram utilizados os *primers* C2 e C10 na pesquisa da deleção $\alpha^{3,7Kb}$ e os *primers* C3 e C10 na pesquisa do alfa triplo ($\alpha\alpha\alpha^{anti\ 3,7kb}$), como descrito por Dodé et al., 1993. A Tabela 7 mostra a seqüência dos *primers*.

Na pesquisa da ($-\alpha^{3,7Kb}$) o produto amplificado gera um fragmento de 2,1kb para o haplótipo normal ($\alpha\alpha$) e de 1,9kb para o haplótipo mutante ($-\alpha^{3,7Kb}$), enquanto na pesquisa do ($\alpha\alpha\alpha^{anti\ 3,7kb}$) o produto amplificado gera um fragmento de 1,9kb para o haplótipo normal ($\alpha\alpha$) e de 2,1kb para o haplótipo mutante ($\alpha\alpha\alpha^{anti\ 3,7kb}$).

Foi utilizada a seguinte reação: 1,0 μ l de DNA (250ng); 2,5 μ l de tampão α^* ; 2,5 μ l de DMSO; 0,75 μ l de dNTP 10mM; 0,5 μ l de cada *primer* 10 μ M; 0,25 μ l de taq 5U/ μ l, completar com água para 25,0 μ l. Condições de ciclagem: desnaturação inicial 94°C - 10'; 30 ciclos : 94°C - 45"; 56°C - 1' e 72°C - 1'; extensão final 72°C - 7'.

Tabela 7: Seqüências dos *primers* para pesquisa da deleção $\alpha^{3,7Kb}$ e do $\alpha\alpha^{anti\ 3,7kb}$. Localização referente ao gene α no cromossomo 16 depositados no banco de dados NCBI (ID: J00153).

<i>Primers</i>	Seqüência do <i>Primer</i> (5'-3')	Direção	Posição
C2	CCATGCTGGCACGTTTCTGA	←	11365
C10	GATGCACCCACTGGACTCCT	→	5641
C3	CCATTGTTGGCACATTCCGG	←	7548

→: sense; ←: anti-sense.

*Tampão α para PCR - Soluções estoque: 3,35 ml de Tris-HCl 2M (pH 8,6); 1,66 ml de $(NH_4)_2 SO_4$ 1M; 250 μ l de $MgCl_2$ 1M; 33,5 μ l de Na_2 EDTA 0,2M; 85 μ l de BSA-20 mg/ml; 70 μ l de β mercaptoetanol 14,3M e completar para 10 ml com dH_2O . Todas as soluções estoque são autoclavadas, exceto $MgCl_2$ que é filtrada.

Além dessas 2 mutações foram investigadas outras formas delecionais e não-delecionais de talassemia α mais prevalentes nas populações.

- Investigação das formas delecionais: α^+ [$-\alpha^{3,7}$ - $\alpha^{4,2}$] e α^0 [$-(\alpha)^{20,5}$, --^{MED}, --^{SEA}, --^{FIL} e --^{THAI}], por PCR multiplex, descrito por Chong et al. (2000).
- Investigação das formas não-delecionais: [α^{HphI} , α^{NcoI} , $\alpha\alpha^{NcoI}$, α^{Ic} , α^{TSAUDI}], por PCR seguido de análise de restrição e por *nested* PCR (α^{TSAUDI}) (Kattamis et al., 1996).

2.12- Detecção do Polimorfismo (TA)_n – Síndrome de Gilbert - Genotipagem

Os polimorfismos no gene UGT1A1 foram investigados no equipamento MegaBACE 1000 (GE Healthcare - Amersham) e analisados pelo software *Fragment Profiler* v1.2. para análise de fragmentos. As amostras foram amplificadas nas seguintes condições de reação: 0,5 μ l de DNA genômico 200ng; 0,8 μ l de *primer* sense marcado com fluoróforo FAM (5 μ M) e 0,8 μ l do *primer* antisense não marcado (10 μ M); 3,0 μ l de Buffer 10X; 1,3 μ l de $MgCl_2$ 50mM; 3,0 μ l de dNTP 1,25mM; 0,4 μ l de taq 5U/ μ l, completar com água para 30,0 μ l. Condições de ciclagem: desnaturação inicial 94°C - 5'; 35 ciclos : 94°C - 30"; 57°C - 40"; e 72°C - 25"; extensão final 72°C - 25'. O produto amplificado tem um

tamanho variando de 96 a 102 pares de base. A seqüência dos *primers* (Tabela 8) foi descrita por Monaghan et al. (1996), e modificadas para aplicação da técnica.

Em uma placa de 96 amostras, os produtos da PCR marcados foram diluídos 20x em água. Em seguida, 2µl de cada diluição foi distribuída em outra placa de 96 amostras previamente preparada com um mistura contendo 7,75µl de *Genotyping Loading Solution* (0,1% de Tween 20 em H₂O) + 0,25µl de MegaBACE Size standards ET550-R, perfazendo um volume final de 10µl. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 3 minutos antes de serem colocadas no equipamento.

Tabela 8: Os *primers* utilizados na amplificação da região promotora do gene *UGT1A1*. As seqüências utilizadas são referentes ao *locus* do gene *UGT1* depositadas no banco de dados NCBI (ID:AF297093).

<i>Primers</i>	Seqüência do <i>Primer</i> (5'-3')	Direção	Posição
<i>UGT1A1</i> (S)	GTCACGTGACACAGTCAAAC	→	174939
<i>UGT1A1</i> (AS)	TTTGCTCCTGCCAGAGGTT	←	175036

→: sense; ←: anti-sense.

Resultados

Foram estudados 119 pacientes atendidos na Fundação HEMOPE. Destes, 11 tinham o diagnóstico de talassemia β maior, 36 talassemia β intermediária e 70 S/ β talassemia. Dois pacientes foram excluídos da análise estatística por se tratarem de hemoglobinas instáveis, ao invés de talassemia intermediária.

Um total de 234 alelos não aparentados foi analisado para mutações no gene β , sendo 70 alelos β^S e 164 alelos β talassêmicos. A caracterização dos alelos β talassêmicos na casuística revelou uma heterogeneidade de 15 diferentes mutações (Tabela 9). No Anexo 1 estão representados os eletroferogramas correspondentes às mutações identificadas e no anexo 3 características hematológicas e moleculares destes pacientes.

Tabela 9: Distribuição das mutações da talassemia β em pacientes com talassemia β homozigota e S/ β Talassemia em PE (n = 47 β tal + 70 S/ β tal).

Mutações β tal.	Nº de Alelos	Frequência	%
IVS-I-6 (T→C)	90	90/164	54,9
IVS-I-5 (G→C)	25	25/164	15,2
Códon 39 (C→T)	13	13/164	7,9
IVS-I-1 (G→A)	10	10/164	6,1
IVS-I-110 (G→A)	5	5/164	3,0
IVS-II-849 (A→G)	5	5/164	3,0
IVS-I-5 (G→A)	4	4/164	2,4
-88 (C→T)	4	4/164	2,4
poli-A (T→C)	2	2/164	1,2
- 29 (A→G)	1	1/164	0,6
Códon 12 (-C)	1	1/164	0,6
Códon 30 (A→C)	1	1/164	0,6
IVS-I-2 (T→C)	1	1/164	0,6
IVS-II-837 (T→G)	1	1/164	0,6
Códons 106/107 (+G)	1	1/164	0,6

De todas essas mutações, 4 correspondem a 84,3% dos alelos β talassêmicos na população de Pernambuco, são elas: IVS-I-6 (T→C); IVS-I-5 (G→C); Códon 39 (C→T) e

IVS-I-1 (G→A). A mutação $\beta^{+ \text{leve}}$ IVS-I-6 (T→C) foi responsável por mais de 50% dos alelos encontrados, seguida da mutação $\beta^{+ \text{grave}}$ IVS-I-5 (G→C) em 15,2%.

Foram encontradas 12 diferentes combinações genóticas nos pacientes com talassemia β maior e talassemia β intermediária (Tabela 10). O genótipo mais comum foi o IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C), onde dos 47 casos analisados, 30 (63,8%) foram homocigotos para essa mutação $\beta^{+ \text{leve}}$. Foram encontrados também 4 pacientes β^0 / β^0 (2 homocigotos para o mesmo tipo de mutação β^0) e 13 heterocigotos compostos (sendo 11 $\beta^{+ \text{leve}}$ / $\beta^{+ \text{grave}}$ e 2 $\beta^{+ \text{leve}}$ / β^0).

Tabela 10: Distribuição dos genótipos nos pacientes com talassemia β maior e talassemia β intermediária (n=47).

Combinação Genotípica	Fenótipo	Frequência (%)
IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	$\beta^{+ \text{leve}} / \beta^{+ \text{leve}}$	30 (63,8)
IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-5 (G→C)	$\beta^{+ \text{leve}} / \beta^{+ \text{grave}}$	6 (12,8)
IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-110 (G→A)	$\beta^{+ \text{leve}} / \beta^{+ \text{grave}}$	2 (4,3)
IVS-I-6 (T→C) / Códon 39 (C→T)	$\beta^{+ \text{leve}} / \beta^0$	1 (2,1)
IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-5 (G→A)	$\beta^{+ \text{leve}} / \beta^{+ \text{grave}}$	1 (2,1)
Códon 39 (C→T) / Códon 39 (C→T)	β^0 / β^0	1 (2,1)
IVS-I-1 (G→A) / IVS-I-1 (G→A)	β^0 / β^0	1 (2,1)
IVS-I-1 (G→A) / IVS-II-849 (A→G)	β^0 / β^0	1 (2,1)
- 29 (A→G) / IVS-I-5 (G→A)	$\beta^{+ \text{leve}} / \beta^{+ \text{grave}}$	1 (2,1)
-88 (C→T) / IVS-I-5 (G→C)	$\beta^{+ \text{leve}} / \beta^{+ \text{grave}}$	1 (2,1)
IVS-I-1 (G→A) / Códon 30 (A→C)	$\beta^0 / \beta^{+ \text{leve}}$	1 (2,1)
Códon12 (-C) / IVS-II-849 (A→G)	β^0 / β^0	1 (2,1)

Os pacientes com talassemia β maior apresentaram os seguintes genótipos: 5 IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-5 (G→C), 1 IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-110 (G→A), 1 homocigoto

Códon 39 (C→T), 1 homozigoto IVS-I-1 (G→A), 1 IVS-I-1 (G→A) / IVS-II-849 (A→G), 1 -88 (C→T) / IVS-I-5 (G→C) e 1 Códon12 (-C) / IVS-II-849 (A→G).

Quando analisada a distribuição das mutações somente entre os pacientes com talassemia β maior e talassemia β intermediária (Tabela 11), a frequência da mutação IVS-I-6 (T→C) foi responsável por 74,5% das mutações, seguido da IVS-I-5 (G→C) com 7,4% dos casos.

Tabela 11: Frequência alelica das mutações nos pacientes com talassemia β maior e talassemia β intermediária (n=47).

Mutações	Fenótipo	FrequênciaAlélica	%
IVS-I-6 (T→C)	β^+ leve	70/94	74,5
IVS-I-5 (G→C)	β^+ grave	7/94	7,4
IVS-I-1 (G→A)	β^0	4/94	4,2
Códon 39 (C→T)	β^0	3/94	3,2
IVS-I-110 (G→A)	β^+ grave	2/94	2,1
IVS-I-5 (G→A)	β^+ grave	2/94	2,1
IVS-II-849 (A→G)	β^0	2/94	2,1
- 29 (A→G)	β^+ leve	1/94	1,1
-88 (C→T)	β^+ leve	1/94	1,1
Códon 30 (A→C)	β^+ leve	1/94	1,1
Códon 12 (-C)	β^0	1/94	1,1

Mutação nova

Uma nova mutação foi detectada, Códon 12 (-C), em uma família procedente da cidade de Timbaúba-PE, de origem étnica desconhecida, em que os pais são traço talassêmicos e três dos filhos apresentam quadro clínico característico de talassemia maior, apenas 1 deles foi incluído no estudo. São crianças de cor negra e cabelos lisos. Os pacientes apresentam dupla heterozigose: IVS-II-849 (A→G) / Códon 12 (-C). Os dados

hematológicos ao diagnóstico e moleculares da família analisada encontram-se na tabela 12.

Tabela 12: Descrição dos dados hematológicos e moleculares da família em estudo.

Casos/Idade	Genótipo	Hm	Hb	VCM	HCM	HbA ₂	HbF
		10 ⁶ /mm ³	g/dl	fl	pg	%	%
Pai (39)	β ^A / Cd 12 (-C)	6,23	13,6	70,7	21,8	5,9	2,1
Mãe (35)	β ^A / IVSII-849 (A→G)	6,61	12,3	64,4	18,6	6,4	2,4
Caso (11)	IVSII-849 / Cd 12 (-C)	2,89	6,6	76,1	22,9	2,7	97,3
Irmão (10)	IVSII-849 / Cd 12 (-C)	2,83	6,4	73,5	22,7	3,1	96,9
Irmã (6)	IVSII-849 / Cd 12 (-C)	2,47	5,2	68,0	21,1	2,9	97,1

Legenda: β^A - alelo β normal.

Os pacientes têm outros 5 irmãos por parte de pai, sendo 3 heterozigotos para a mutação códon 12 (-C) (Figura 5) e 2 normais.

A mutação códon 12 (-C) provoca uma terminação prematura (*stop codon*) no códon 18 do gene β (TGA), levando a uma mutação do tipo β⁰.

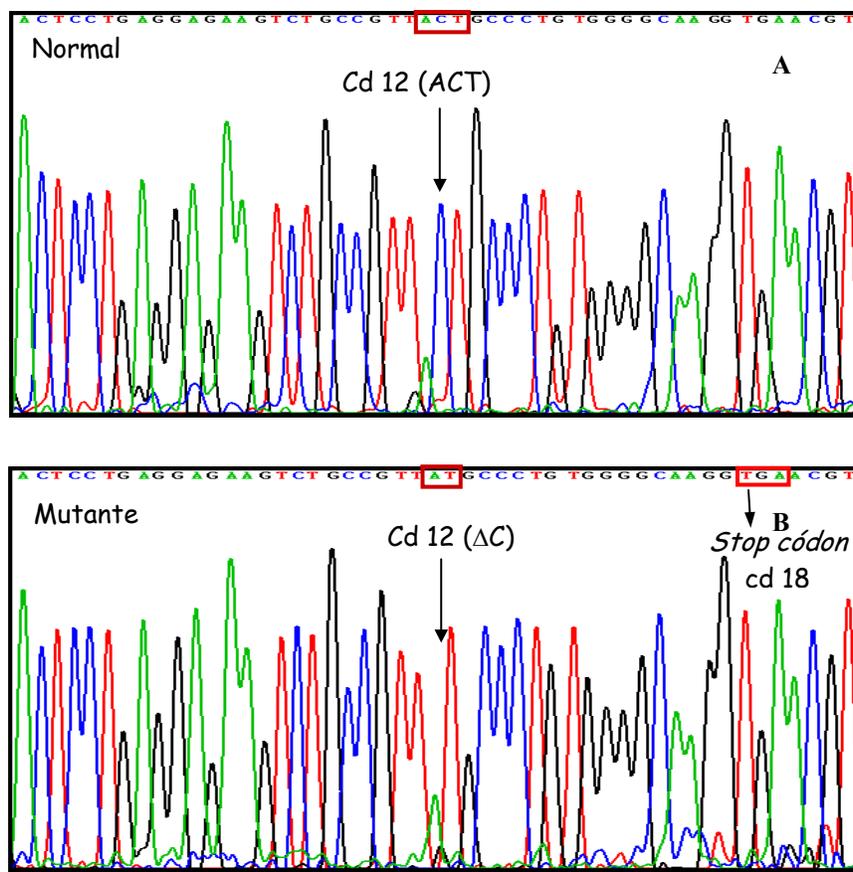


Figura 5 - Eletroferograma do gene da globina β humana, identificando a mutação para talassemia β . **A**. Fita sense normal de uma região do éxon 1; **B**. Fita sense com a deleção de um nucleotídeo C no códon 12, com a formação de um *stop códon* no códon 18. Produto de PCR clonado em vetor pGEM-T easy vector (PROMEGA).

Mutação rara

A mutação códon 30 (AGG→CGG) esteve presente em um paciente com quadro clínico de talassemia β intermediária, em heterozigose composta com a mutação β^0 IVS-I-1 (G→A). Apresentando Hb basal de 7,6g/dl, Hb Fetal: 72,2%, HbA: 24,7% e HbA₂: 3,1%. O paciente de 48 anos de idade, foi diagnosticado aos 35 anos com ferritina bastante elevada (4728,0 ng/ml), úlcera maleolar, *diabetes mellitus* e raramente necessitando de transfusões. O paciente teve puberdade e espermatogênese espontâneas, sendo pai de três filhos.

S/ β talassemia

Com relação aos pacientes com a interação S/ β talassemia, foram encontradas 12 diferentes combinações genótípicas, sendo 25 pacientes com mutações do tipo $\beta^{+ \text{ leve}}$, 24 $\beta^{+ \text{ grave}}$ e 21 β^0 (Tabela 13). A combinação mais freqüente foi a HBB*S / IVS-I-6 (T \rightarrow C), presente em 20 pacientes (28,5%), seguido da HBB*S / IVS-I-5 (G \rightarrow C) em 18 casos (25,7%), HBB*S / Códon 39 (C \rightarrow T) em 10 (14,3%), HBB*S / IVS-I-1 (G \rightarrow A) em 6 (8,6%) e outras interações em menores proporções.

Tabela 13: Distribuição genotípica dos portadores de S/ β talassemia em Pernambuco (n=70).

Combinação Genotípica	Fenótipo β	Freqüência (%)
HBB*S / IVS-I-6 (T \rightarrow C)	$\beta^{+ \text{ leve}}$	20 (28,5)
HBB*S / IVS-I-5 (G \rightarrow C)	$\beta^{+ \text{ grave}}$	18 (25,7)
HBB*S / Códon 39 (C \rightarrow T)	β^0	10 (14,3)
HBB*S / IVS-I-1 (G \rightarrow A)	β^0	6 (8,6)
HBB*S / IVS-I-110 (G \rightarrow A)	$\beta^{+ \text{ grave}}$	3 (4,3)
HBB*S / -88 (C \rightarrow T)	$\beta^{+ \text{ leve}}$	3 (4,3)
HBB*S / IVS-II-849 (A \rightarrow G)	β^0	3 (4,3)
HBB*S / IVS-I-5 (G \rightarrow A)	$\beta^{+ \text{ grave}}$	2 (2,9)
HBB*S / poli-A (T \rightarrow C)	$\beta^{+ \text{ leve}}$	2 (2,9)
HBB*S / IVS-I-2 (T \rightarrow C)	β^0	1 (1,4)
HBB*S / IVS-II-837 (T \rightarrow G)	$\beta^{+ \text{ grave}}$	1 (1,4)
HBB*S / Códons 106/107 (+G)	β^0	1 (1,4)

Mutação rara

A mutação IVS-II-837 (T \rightarrow G) foi encontrada em associação com o gene da HbS, em um garoto de origem indiana de 11 anos de idade. Os dados hematológicos revelaram Hb basal de 7,9g/dl, HbS: 76,7%; Hb Fetal: 11,4%, HbA: 6,0% e HbA₂: 5,9%. Clinicamente apresentou-se com um quadro clínico de gravidade moderada, com poucas intercorrências e transfundido apenas 4 vezes aos 2 anos de idade.

Com relação à distribuição dos haplótipos β^{Tal} associados com as mutações talassêmicas identificadas observamos a prevalência do haplótipo VI devido à alta frequência da mutação IVS-I-6 (T→C). Os demais haplótipos estão descritos na tabela 14.

Tabela 14: Distribuição das mutações da talassemia β e seus respectivos haplótipos.

Mutação	Haplótipos β^{Tal}	Nº
IVS-I-6 (T→C)	VI	85
IVS-I-6 (T→C)	ATP	5
IVS-I-5 (G→C)	I	22
IVS-I-5 (G→C)	ATP	3
Códon 39 (C→T)	II	11
Códon 39 (C→T)	I	2
IVS-I-1 (G→A)	V	9
IVS-I-1 (G→A)	ATP	1
IVS-I-110 (G→A)	I	5
IVS-II-849 (A→G)	ATP	5
-88 (C→T)	ATP	4
IVS-I-5 (G→A)	V	4
Poli A (T→C)	I	2
IVS-I-2 (T→C)	ATP	1
IVS-II-837 (T→G)	V	1
Códons 106/107 (+G)	V	1
Códon 30 (A→C)	IX	1
- 29 (A→G)	IX	1
Códon 12 (-C)	I	1

Legenda: ATP - Atípico

A tabela 15 mostra a combinação genotípica das mutações com seus respectivos haplótipos e fenótipos nos pacientes com talassemia β maior e talassemia β intermediária.

Tabela 15: Distribuição dos genótipos, fenótipos e haplótipos β^{tal} (n=47).

Genótipos	Haplótipos	Fenótipos	N
IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	TI	28
IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / ATP	TI	2
IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-5 (G→C)	VI / I	3 TM e 1 TI	4
IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-5 (G→C)	ATP / I	TM	2
IVS-I-6 (T→C) / Códon 39 (C→T)	VI / II	TI	1
Códon 39 (C→T) / Códon 39 (C→T)	II / II	TM	1
IVS-I-1 (G→A) / IVS-I-1 (G→A)	V / V	TM	1
IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-110 (G→A)	VI / I	1 TM e 1 TI	2
IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-5 (G→A)	VI / V	TI	1
IVS-I-1 (G→A) / IVS-II-849 (A→G)	V / ATP	TM	1
Códon 12 (-C) / IVS-II-849 (A→G)	I / ATP	TM	1
IVS-I-1 (G→A) / Códon 30 (A→C)	ATP / IX	TI	1
-88 (C→T) / IVS-I-5 (G→C)	ATP / I	TM	1
-29 (A→G) / IVS-I-5 (G→A)	IX / V	TI	1

Legenda – ATP: Atípico; TM: Talassemia β Maior; TI: Talassemia β Intermediária

Os pacientes homozigotos IVS-I-6 (T→C) tiveram uma grande homogeneidade com o haplótipo VI, onde 28 pacientes foram homozigotos para este haplótipo.

Tabela 16: Mutações β talassêmicas e os haplótipos β^S / β^{Tal} nos pacientes com a interação S/ β talassemia (n=70).

Mutação β^{Tal}	Haplótipo β^S / β^{Tal}	n ^o	HbS (%)	HbF (%)	HbA (%)	HbA ₂ (%)	Hb (g/dL)
IVS-I-6 (T→C)	CAR / VI	15	67,5	1,9	26,6	4,4	11,7
IVS-I-6 (T→C)	ATP / VI	2	65,8	1,7	28,1	4,4	10,7
IVS-I-6 (T→C)	Benin / VI	1	69,2	1,1	25,4	4,3	11,2
IVS-I-6 (T→C)	CAM / VI	1	67,0	0,5	28,1	4,4	11,3
IVS-I-6 (T→C)	SEN / ATP	1	69,1	1,9	23,3	5,7	11,7
IVS-I-5 (G→C)	CAR / I	9	74,9	15,8	5,4	4,0	7,2
IVS-I-5 (G→C)	Benin / I	6	73,7	15,8	5,7	4,8	7,5
IVS-I-5 (G→C)	CAR / ATP	3	65,8	25,4	4,6	4,6	8,1
Códon 39 (C→T)	CAR / II	7	85,5	10,7	0	5,8	7,9
Códon 39 (C→T)	CAR / I	2	84,0	14,0	0	4,5	7,4
Códon 39 (C→T)	Benin / II	1	88,5	6,8	0	4,7	7,8
IVS-I-1 (G→A)	CAR / V	6	80,8	13,8	0	5,4	7,4
IVS-I-110 (G→A)	CAR / I	3	72,2	11,4	11,5	4,8	8,3
-88 (C→T)	CAR / ATP	2	62,0	14,0	19,5	4,8	12,0
-88 (C→T)	ATP / ATP	1	60,0	17,9	18,0	4,1	10,5
IVS-II-849 (A→G)	CAR / ATP	3	79,0	15,4	0	5,6	8,2
IVS-I-5 (G→A)	CAR / V	2	76,0	12,0	6,6	5,4	9,1
poli-A (T→C)	CAR / I	1	71,8	3,6	20,2	4,4	9,1
poli-A (T→C)	Benin / I	1	71,7	2,4	21,1	4,8	11,0
IVS-I-2 (T→C)	CAR / ATP	1	80,4	15,0	0	4,6	7,8
IVS-II-837 (T→G)	CAR / V	1	76,7	11,4	6,0	5,9	7,6
Códons 106/107(+G)	Benin / V	1	83,6	10,9	0	5,5	7,7

Legenda – ATP: Atípico

Todos os pacientes com S/ β talassemia que apresentaram HbS associada a uma mutação β^+ leve, tinham níveis de HbA $\geq 18\%$. Quando analisamos os pacientes que apresentaram a mesma combinação genotípica, porém diferentes haplótipos β^S / β^{tal} , não notamos nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os dados hematológicos dos pacientes e nem na composição das hemoglobinas, pelo menos nos 3 maiores grupos (Tabela 16).

Quanto à distribuição dos haplótipos β^S : 55 foram Bantu (78,6%), 10 Benin (14,3%), 3 Atípicos (4,3%), enquanto que os haplótipos Camarões e Senegal foram encontrados em apenas 1 (1,4%) paciente cada.

Genótipo α

Todos os pacientes apresentaram-se normais para as mutações deletionais α^+ [$-\alpha^{4,2}$] e α^0 [$-(\alpha)^{20,5}$, --^{MED}, --^{SEA}, --^{FIL} e --^{THAI}] e as não deletionais [α^{HphI} , α^{NcoI} , $\alpha\alpha^{NcoI}$, α^{Ic} , α^{TSAUDI}].

A deleção ($-\alpha^{3,7}$ kb) esteve presente em 2 (4,2%) dos pacientes homocigotos para talassemia β e em 11 (15,7%) dos pacientes com S/ β talassemia (Figura 6 e Tabelas 17 e 18, respectivamente).

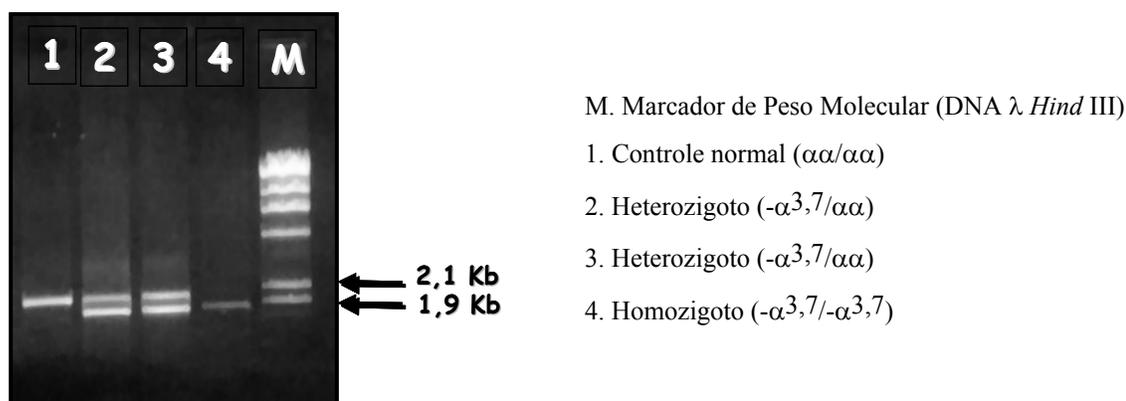


Figura 6: Análise por PCR do gene da globina α humana, com a identificação da deleção ($-\alpha^{3,7}$ kb).

Tabela 17: Genótipo da talassemia β nos pacientes que apresentaram a $-\alpha^{3,7\text{kb}}$.

$\beta^{\text{Tal}} / \beta^{\text{Tal}}$	n	Genótipo α
Códon 39 (C→T) / Códon 39 (C→T)	1	$-\alpha^{3,7\text{kb}} / \alpha\alpha$
IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-5 (G→C)	1	$-\alpha^{3,7\text{kb}} / \alpha\alpha$

Tabela 18: Genótipo da S/ β talassemia nos pacientes que apresentaram a $-\alpha^{3,7\text{kb}}$.

S / β^{Tal}	n	Genótipo α
HBB*S / IVS-I-6 (T→C)	3	$-\alpha^{3,7\text{kb}} / \alpha\alpha$
HBB*S / Códon 39 (C→T)	3	$-\alpha^{3,7\text{kb}} / \alpha\alpha$
HBB*S / IVS-I-1 (G→A)	2	$-\alpha^{3,7\text{kb}} / \alpha\alpha$
HBB*S / IVS-I-5 (G→C)	1	$-\alpha^{3,7\text{kb}} / \alpha\alpha$
HBB*S / IVS-I-5 (G→A)	1	$-\alpha^{3,7\text{kb}} / \alpha\alpha$
HBB*S / Poli-A (T→C)	1	$-\alpha^{3,7\text{kb}} / \alpha\alpha$

Nenhum paciente homocigoto para talassemia β apresentou a triplicação do gene α . ($\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3,7\text{kb}}$), enquanto 4 (5,7%) dos S/ β talassemia apresentaram o $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3,7\text{kb}}$ em heterocigose (Figura 7 e Tabela 19).

Tabela 19: Genótipo da S/ β talassemia nos pacientes que apresentaram a $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3,7\text{kb}}$.

$\beta^{\text{Tal}} / \beta^{\text{Tal}}$	n	Genótipo α
HBB*S / IVS-I-6 (T→C)	1	$\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3,7\text{kb}} / \alpha\alpha$
HBB*S / IVS-I-5 (G→C)	2	$\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3,7\text{kb}} / \alpha\alpha$
HBB*S / IVS-II-849 (A→G)	1	$\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3,7\text{kb}} / \alpha\alpha$

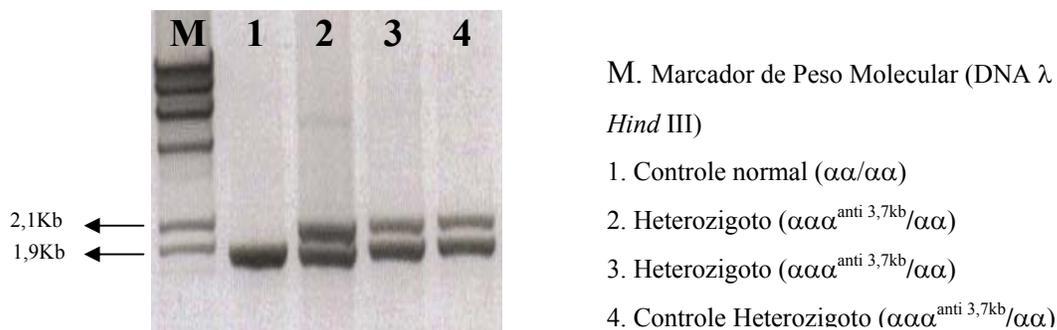


Figura 7: Análise por PCR do gene da globina α humana, com a identificação da triplicação do gene α .

Polimorfismo -158 γ^G (C \rightarrow T) *Xmn*I

O polimorfismo *Xmn*I (Figura 8) esteve presente em heterozigose em 6,4% dos pacientes com β talassemia homozigota e mostrou desequilíbrio de ligação com as mutações IVS-I-6 (T \rightarrow C), códon 30 (A \rightarrow C) e - 29 (A \rightarrow G), estando as duas últimas associadas com o haplótipo IX e a primeira com o atípico (ATP). Apenas um paciente com S/ β talassemia (1,4%) foi heterozigoto para o polimorfismo *Xmn*I (ligado ao β^S Senegal, que está sendo descrito pela 1ª vez em Pernambuco).

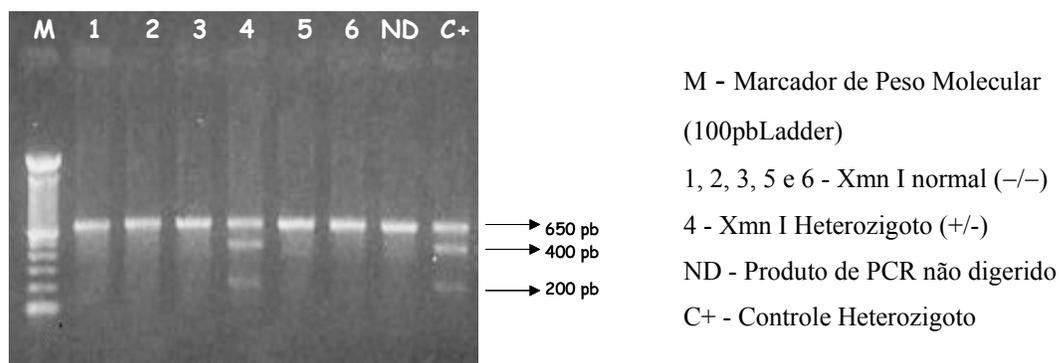


Figura 8: Análise por PCR do Polimorfismo -158 γ^G (C \rightarrow T) *Xmn* I.

Homozigotos para a mutação β^+ IVS-I-6 (T \rightarrow C)

O quadro clínico e laboratorial na talassemia β é muito variável, mesmo considerando-se um determinado genótipo molecular, por exemplo, a mutação IVS-I-6 (T→C) em homozigose. Os dados hematológicos desses pacientes estão representados na Tabela 20.

Tabela 20: Dados hematológicos e bioquímicos dos pacientes homozigotos para a mutação β^+ IVS-I-6 (T→C) n=30.

Dados	Média/Desvio Padrão e Variação
Hm (10^6mm^3)	$3,91 \pm 0,5$ (3,17 - 4,99)
Hb (g/dl)	$7,6 \pm 0,6$ (6,8 - 9,0)
VCM (fL)	$67,0 \pm 7,9$ (50,6 - 76,8)
HCM (pg)	$19,7 \pm 2,1$ (15,6 - 22,7)
Ret (%)	$8,2 \pm 3,6$ (2,5 - 15,0)
HbA ₂ (%)	$7,1 \pm 0,9$ (5,6 - 8,7)
HbF (%)	$10,6 \pm 5,3$ (2,0 - 20,8)
BI (mg/dL)	$2,9 \pm 1,3$ (0,96 - 6,82)

Foram encontrados 30 pacientes homozigotos IVS-I-6 (T→C), sendo 17 mulheres e 13 homens, com idade média de $40,9 \pm 14,2$ (14 - 83), e com idade média ao diagnóstico de $28,9 \pm 15,2$. Todos os pacientes foram clinicamente classificados como talassêmicos β intermediários.

Observou-se alguma variação nos níveis de Hb: 6,8-9,0g/dL e HbF: 2,0-20,8%. No entanto, não houve correlação dos níveis de Hb com sexo, idade, esplenectomia e com níveis de HbF. Todos pacientes apresentaram níveis de HbA₂ elevada, com média de 7,1 (5,6-8,7), e genótipo α globínico normal. Com relação aos haplótipos, 28 pacientes foram homozigotos para o haplótipo VI (de acordo com os dados da literatura para essa mutação), e 2 pacientes apresentaram o haplótipo VI / Atípico. Quanto ao polimorfismo *XmnI*, apenas um paciente foi heterozigoto (+/-), com níveis de HbF de 13,8%.

Vinte e dois pacientes (73,3%) apresentaram litíase biliar. Úlceras maleolares estiveram presentes em 9 pacientes (30%), 2 (6,6%) apresentaram episódios de AVC. Mais

da metade dos pacientes (76,6%) foram esplenectomizados e todos apresentaram hepatomegalia. Com relação à necessidade transfusional: 6 pacientes nunca receberam transfusões; 5 pacientes receberam apenas 1 transfusão (para retirada do baço); 10 pacientes até 10 transfusões (após esplenectomia, não transfundiram novamente). Nove pacientes são transfundidos esporadicamente.

Genótipos β^S/β^{tal} IVSI-5 (G→C) e β^S/β^{tal} IVSI-6 (T→C)

Devido aos grupos β^S/β^{tal} IVSI-5 (G→C) e β^S/β^{tal} IVSI-6 (T→C) apresentarem quantidades similares de HbS e diferença nas suas quantidades de HbF e HbA, as características clínicas e laboratoriais desses 2 grupos foram analisadas e comparadas (Tabelas 21 e 22).

No grupo dos pacientes β^S/β^{tal} IVS-I-6, a idade média ao diagnóstico foi de $17,0 \pm 8,8$ anos, superior a $5,8 \pm 5,4$ anos de idade no grupo β^S/β^{tal} IVS-I-5. Esse parâmetro analisado pode ser a primeira evidência de uma gravidade clínica maior entre os β^S/β^{tal} IVS-I-5.

Tabela 21: Comparação dos dados hematológicos de pacientes β^S/β^{tal} IVS-I-5 e β^S/β^{tal} IVS-I-6.

Genótipos (β^S/β^{tal})	Hb (g/dL)	HbS (%)	HbA (%)	HbF (%)	HbA ₂ (%)	Ret (%)
S / IVS-I-5 (G → C) n = 18	7,4 ± 1,0	72,9 ± 8,2	5,2 ± 1,3	17,6 ± 9,1	4,3 ± 0,8	8,8 ± 4,7
S / IVS-I-6 (T → C) n = 20	11,6 ± 0,9	67,4 ± 1,7	26,3 ± 1,4	1,8 ± 1,2	4,5 ± 0,5	2,7 ± 0,9

Todos os valores (com exceção da HbS e HbA₂) foram estatisticamente diferentes entre os 2 grupos (p<0.001, Wilcoxon rank sum test).

Tabela 22: Comparação dos dados clínicos de pacientes β^S/β^{tal} IVS-I-5 e β^S/β^{tal} IVS-I-6.

Genótipos (β^S/β^{tal})	E (n)	T (%)	AHI (%)	AHC (%)
S / IVS-I-5 (G → C) n = 18	6	72	89 (16)	61 (11)
S / IVS-I-6 (T → C) n = 20	0	0	5 (1)	10 (2)

E: Esplenectomia (nº de pacientes); **T:** Transusão (mais que 3 eventos transfusionais); **AHI:** Admissão Hospitalar por Infecção (frequência); **AHC:** Admissão Hospitalar por Crise de Dor (frequência: mais que 3 episódios vaso-oclusivos). Todos os valores foram estatisticamente diferentes entre os 2 grupos ($p < 0.001$, Wilcoxon rank sum test).

Genótipo *UGT1A1*

Identificamos os 4 alelos previamente descritos para o promotor do gene *UGT1A1*, nas respectivas frequências: 1,3% (TA)₅, 61,1% (TA)₆, 37,1% (TA)₇ e 1,3% (TA)₈ (Tabela 23).

Tabela 23: Frequência dos alelos *UGT1A1* nos 117 pacientes (47 homocigotos para talassemia β e 70 S/ β talassêmicos).

Alelos <i>UGT1A1</i>	n	%
(TA) ₅	3	1,3
(TA) ₆	143	61,1
(TA) ₇	85	36,3
(TA) ₈	3	1,3

Com relação ao genótipo *UGT1A1* foram identificados 7 dos 10 genótipos possíveis (Tabela 24 e Anexo 2). Os genótipos relacionados com Síndrome de Gilbert

estiveram presentes em 18,0% dos pacientes, sendo 20 (17,1%) homozigotos (TA)₇ e 1 (0,85%) heterozigoto (TA)₇ / (TA)₈.

Tabela 24: Genótipos no promotor do gene *UGT1A1* nos 117 pacientes (47 homozigotos para talassemia β e 70 S/β talassêmicos).

Genótipo <i>UGT1A1</i>	n	%
(TA) ₅ / (TA) ₆	1	0,85
(TA) ₅ / (TA) ₇	2	1,7
(TA) ₆ / (TA) ₆	49	41,9
(TA) ₆ / (TA) ₇	42	35,9
(TA) ₆ / (TA) ₈	2	1,7
(TA) ₇ / (TA) ₇	20	17,1
(TA) ₇ / (TA) ₈	1	0,85

Esses pacientes foram divididos em 3 grupos de acordo com seus genótipos *UGT1A1*: Grupo I [homozigotos (TA)₆ / (TA)₆ e heterozigotos com pelo menos um alelo (TA)₅], Grupo II [heterozigotos (TA)₆ / (TA)₇ e (TA)₆ / (TA)₈] e Grupo III [homozigotos (TA)₇ / (TA)₇ e heterozigotos (TA)₇ / (TA)₈], associados respectivamente com baixos, intermediários e altos níveis de bilirrubina não conjugada e risco de colelitíase (Tabela 25).

Tabela 25: Níveis de bilirrubina indireta e a freqüência de colelitíase nos três grupos.

Grupos	Bilirrubina Indireta	Colelitíase
I (n: 52)	1,69 ± 1,0 mg/dL	19 (36,5%)
II (n: 44)	1,85 ± 0,9 mg/dL	17 (36,9%)
III (n: 21)	5,00 ± 3,0 mg/dL	13 (61,9%)

A média da bilirrubina indireta no grupo III foi significativamente mais alta que a média de bilirrubina indireta ($p < 0.001$) dos pacientes dos Grupos I e II. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de bilirrubina indireta dos pacientes

dos Grupos I e II ($p=0.4$) “Kruskal-Wallis”. Pacientes do Grupo III tiveram maior tendência a desenvolver colelitíase do que os dos grupos I e II, embora esses resultados não sejam estatisticamente significantes ($p=0,068$) “Fisher's Exact Test”.

Hemoglobinas instáveis

Outros dois pacientes foram excluídos da casuística. Ambos foram encaminhados para investigação de anemia hemolítica, apresentando icterícia, hepatoesplenomegalia e necessidade de transfusões sangüneas, fenótipo clínico muito parecido com uma talassemia β intermediária. Após análise molecular, bioquímica e funcional, verificamos que se tratavam de hemoglobinas instáveis.

Caso I

Paciente caucasóide de 8 anos, procedente de Caruaru-PE. Os dados hematológicos obtidos foram os seguintes: Hm=3,57 ($10^6/\text{mm}^3$), Hb=8,2 g/dL, VCM=75,9 fL, HCM=23,0 pg e contagem de reticulócitos de 12,0%. A dosagem de bilirrubina total foi 2,5 mg/dL e bilirrubina indireta de 1,54 mg/dL. A dosagem de haptoglobina foi inferior a 7,31 mg/dL, de ferritina 96,82 ng/mL e de ferro sérico/TIBC 60,0 $\mu\text{g/dL}$ e 211,0 $\mu\text{g/dL}$, respectivamente.

Nas eletroforeses de Hb e de cadeias globínicas, bem como no HPLC, nenhuma hemoglobina anômala foi observada. As dosagens das hemoglobinas A₂ e Fetal foram de 4,2% e 7,8%, respectivamente. A focalização isoelétrica revelou apenas frações de Hb A e Hb Fetal, mas a banda correspondente a Hb Fetal foi de 20%.

A análise molecular do gene da globina β identificou uma mutação no códon 122 (TTC→TCC), em heterozigose, que causa a substituição do aminoácido fenilalanina por serina na correspondente posição da cadeia β (Figura 9).

Os testes de instabilidade foram todos positivos, incluindo a pesquisa de corpos de Heinz. Os testes funcionais demonstraram afinidade aumentada pelo O₂ (com e sem fosfatos orgânicos), bem como uma cooperatividade diminuída comparada com a Hb A, compatível com a instabilidade apresentada.

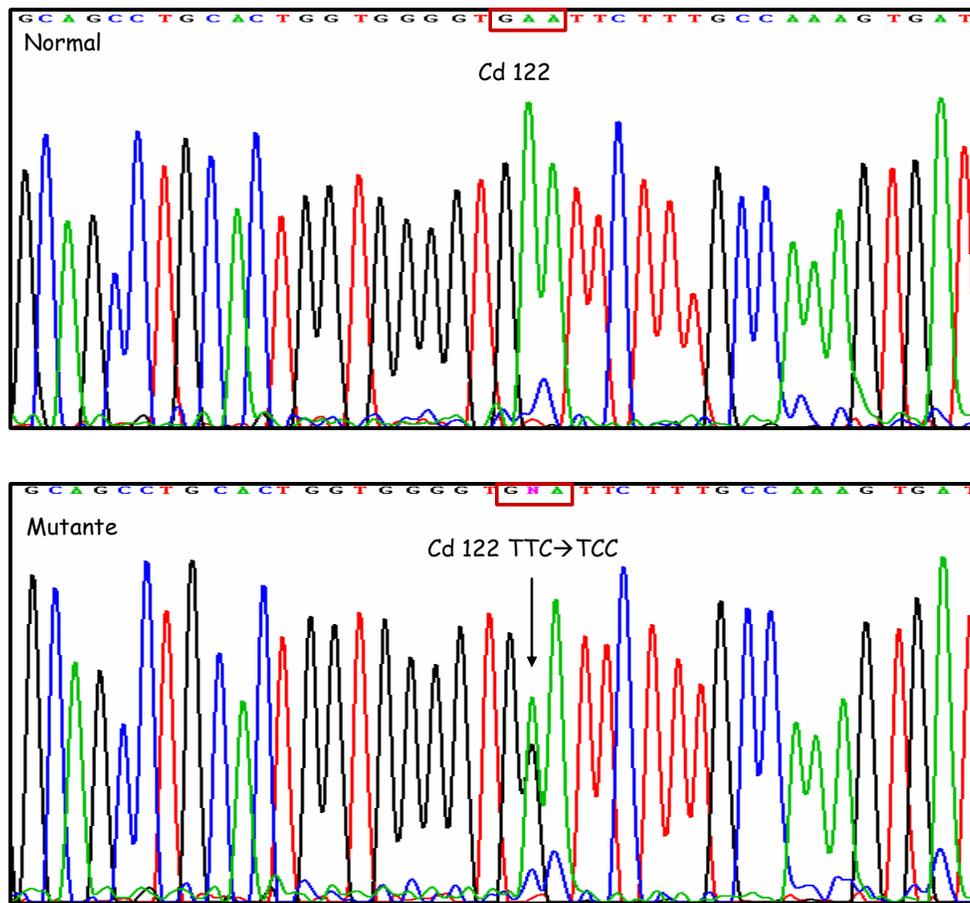


Figura 9: Eletroferograma da fita antisense do gene da globina β humana. A. Fita antisense normal de uma região do éxon 3. B. Fita antisense com a mutação no códon 122 (TTC→TCC) do éxon 3.

O paciente apresentou ainda heterozigotidade do polimorfismo *XmnI*, o que poderia se relacionar ao aumento de Hb Fetal observado. O genótipo alfa foi normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$).

A análise familiar mostrou que o pai do paciente, bem como 6 de seus 12 tios (irmãos do pai do paciente) e 3 primos, também eram portadores da Hb Caruaru (Figura 10). Todos os portadores apresentavam anemia hemolítica crônica. Nenhuma mutação, no entanto, foi detectada no DNA de seus avós, embora a maternidade e paternidade tenham sido confirmadas. O DNA do esperma do avô foi analisado e não mostrou nenhuma alteração, sugerindo que a mutação esteja nas células germinativas da avó.

Essa mutação não havia sido previamente descrita, e foi denominada de Hb Caruaru, devido à procedência da família.

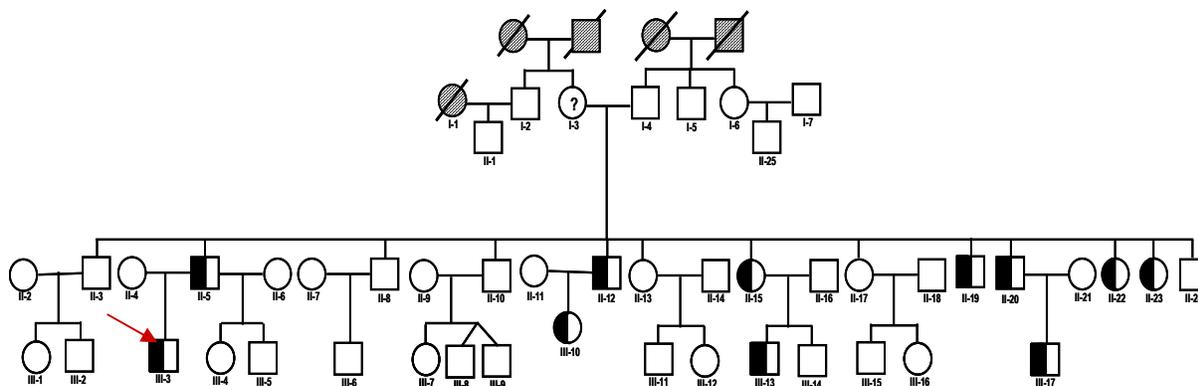


Figura 10: Heredograma da família da Hb Caruaru. → Caso descrito.

Caso II

Uma mulher caucasiana, 36 anos, descendência portuguesa, procedente de Olinda-PE. Os dados hematológicos e bioquímicos foram os seguintes: Hm=3,48 ($10^6/\text{mm}^3$), Hb=7,8 g/dL, VCM=76,4 fL, HCM=22,4 pg, reticulócitos=18,6%, bilirrubina total=5,2 mg/dL e indireta= 4,6mg/dL, haptoglobina < 7,3 mg/dL, ferritina=18,6 ng/mL, ferro sérico=79,0 $\mu\text{g/dL}$ e TIBC=421,0 $\mu\text{g/dL}$.

A eletroforese de Hb (alcalina) apresentou uma banda no lugar de HbS (7%). As eletroforeses ácida e de cadeias globínicas foram normais. As dosagens das hemoglobinas A2 e Fetal por HPLC foram de 9,3% e 1,5%, respectivamente. Na FIE foram observadas bandas na posição de HbS (3%) e HbC (4%). Os testes de instabilidade foram todos positivos, incluindo a pesquisa de corpos de Heinz. Testes funcionais sugeriram baixa afinidade desta Hb pelo O₂ na ausência de fosfatos orgânicos e alta afinidade quando estes foram adicionados, e cooperatividade diminuída comparada com a Hb A, compatível com a instabilidade apresentada.

O seqüenciamento do gene da globina β demonstrou deleção de 12 pares de base (-GAAGTTGGTGGT), removendo os códons 22 a 25, em heterozigose, confirmado por clonagem (Figura 11). Essa mutação também não havia sido previamente descrita, e foi denominada de Hb Olinda, devido à procedência da paciente.

Fita Sense – Cds 22/23/24/25 (-12pb) – Hb Olinda

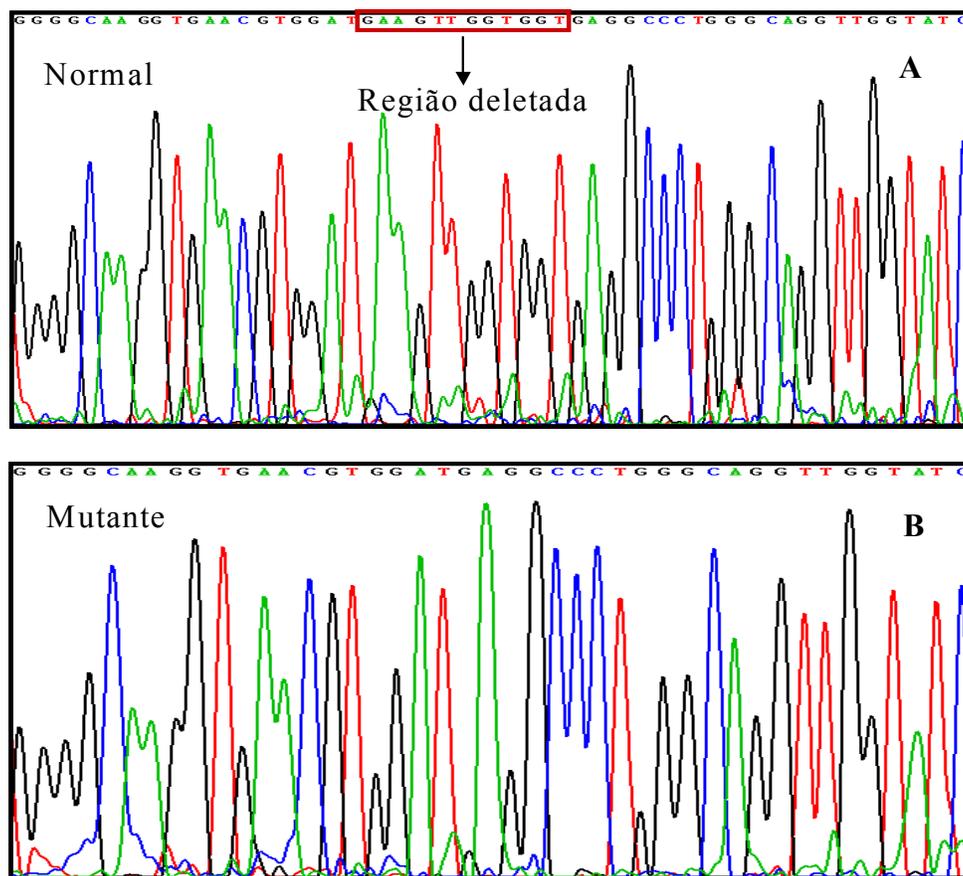


Figura 11: Eletroferograma da fita sense do gene da globina β humana. A. Fita sense normal de uma região do éxon 1. B. Fita sense com a deleção Códons 22/23/24/25 (-12pb: -GAAGTTGGTGGT) do éxon 1. Produto de PCR clonado em vetor pGEM-T easy vector (PROMEGA).

O paciente apresentou o polimorfismo *Xmn* I normal e a análise do gene da globina α mostrou heterozigose para a deleção $-\alpha^{3.7\text{ kb}}$.

O pai e o filho da paciente são clínica e hematologicamente normais (HbAA, $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ e $-\alpha/\alpha\alpha$, respectivamente), enquanto a mãe é heterozigota da HbS (HbAS) e também apresenta a deleção $-\alpha^{3.7\text{ kb}}$ em heterozigose; eles não apresentaram Hb Olinda,

embora os testes de maternidade e paternidade tenham sido confirmados. Na figura 12 encontra-se o heredograma da família.

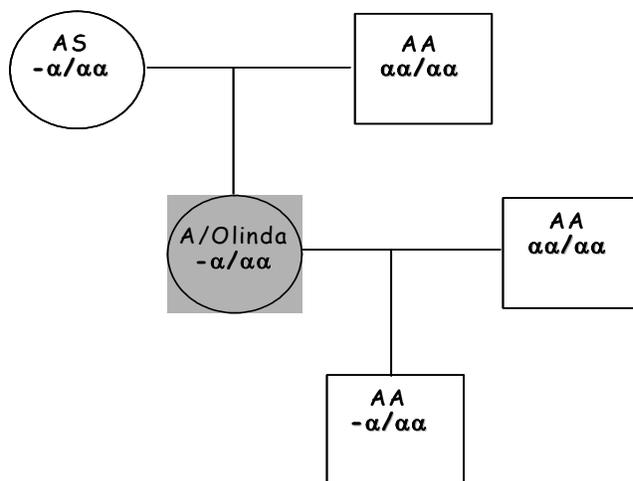


Figura 12: Heredograma da família da Hb Olinda.

Discussão

A talassemia β é uma doença hereditária freqüente da Hb e tem sido encontrada na maioria das populações estudadas (Weatherall e Clegg, 1981). A ocorrência da talassemia β no Brasil tem sido estudada ao longo do tempo, entretanto, por causa das limitações nas metodologias utilizadas em muitas pesquisas, os dados de prevalência e diversidade são incompletos. Além disso, como consequência da composição étnica do nosso país, miscigenada por elementos de origens européia, africana, asiática e indígena, e desigualmente distribuída, a incidência da talassemia pode variar de região para região. A freqüência de heterozigotos na população caucasóide do Sudeste do país é de 0,8 a 1,3% (Zago et al., 1983; Ramalho, 1999), e a freqüência de heterozigotos entre paulistas descendentes de italianos não miscigenados é em torno de 6,4% (Ramalho, 1976), enquanto Pernambuco apresenta freqüência estimada de 0,7% (Almeida et al., 2005). O estado de Pernambuco tem aproximadamente 8 milhões de habitantes e há estimativa de 65 homozigotos para talassemia e cerca de 80 pacientes com a interação S/ β talassemia atendidos no Hemocentro – HEMOPE.

Embora mais de 200 alelos de talassemia β tenham sido caracterizados (HbVar, <http://globin.cse.psu.edu/globin/hbvar/>), o espectro das mutações difere entre os grupos étnicos em cada população e, em geral, poucas mutações são mais comuns, com um número variável de mutações raras (Flint, 1998). Essas mutações que afetam o gene da globina β levam à redução (β^+) ou ausência (β^0) da síntese de cadeias β -globínicas, resultando em três principais fenótipos clínicos de talassemia β : talassemia β maior, talassemia β menor e talassemia β intermediária (Ho et al., 1998).

Homozigotos para talassemia β usualmente resultam na condição de talassemia maior, uma anemia clinicamente grave, na qual pacientes afetados requerem tratamento de transfusões de sangue regulares e terapia de quelação de ferro desde a infância para sobreviver. Existe, entretanto, uma forma mais benigna dessa combinação, na qual os pacientes não são dependentes de transfusão ou requerem apenas transfusões ocasionais, denominada talassemia intermediária (Weatherall, 2001). Tendo em vista a fisiopatologia da talassemia β , podemos identificar alguns fatores capazes de reduzir o desequilíbrio entre as cadeias globínicas resultando em uma forma mais leve de talassemia. Entre esses, podemos citar a presença de pelo menos um alelo β talassêmico silencioso ou leve, associado à alta produção de cadeias globínicas β , e co-herança com talassemia α ou

determinantes genéticos que aumentam a produção de cadeias γ (Galanello e Cao, 1998; Ho et al., 1998). As bases moleculares da talassemia β intermediária pode variar de uma população para outra, dependendo da prevalência de alguns desses fatores (Thein, 1998).

Neste estudo a mutação mais freqüente foi a IVS-I-6 (T \rightarrow C) que esteve presente em 90 dos 164 alelos estudados, ou seja, 54,5%. Essa mutação, em homozigose, causa um quadro clínico β talassêmico intermediário, descrito, concomitantemente em Portugal (com o nome de “ β talassemia portuguesa”) e no Brasil em uma família de descendentes de portugueses (Tamagnini et al., 1983; Costa et al., 1991). Posteriormente foi observada em todas as regiões do Mediterrâneo. Portanto, essa mutação tem sua maior prevalência no Mediterrâneo, em populações do centro de Portugal, onde corresponde a 29,4% dos alelos (Ribeiro et al., 1997), assim como nas regiões montanhosas da Palestina, onde compõe 48,5% dos alelos da população (El-Latif et al., 2002).

Devido à alta freqüência da IVS-I-6 (T \rightarrow C) em Pernambuco e por se tratar de uma mutação de efeitos clínicos leves, mesmo em homozigose, deve ter ocorrido o que se chama de efeito fundador (Flint et al., 1998), assim como observado no estudo da Palestina (El-Latif et al., 2002). Como consequência da invasão holandesa no estado de Pernambuco, que durou de 1630 a 1654 (Lima, 1895), grupos de brasileiros mestiços, de portugueses e de indígenas migraram e se alojaram além dos 60 km do Recife até onde ocorreu o maior domínio batavo (Melo, 2000). Foram assim constituindo agrupamentos familiares na Zona da Mata e Agreste do estado (Vitória de Santo Antão, Pombos, Frei Miguelinho, Pesqueira, Belo Jardim, Bezerras, Ibirajuba, Timbaúba, Agrestina, Caruaru) de onde são procedentes, predominantemente, os indivíduos da amostragem. Por isso, as oportunidades para que se produzisse uma mais ampla variabilidade genética não aconteceram. O efeito fundador ocorre em aglomerados populacionais que se isolam e produzem pouca mobilidade genética, nesse caso, esse fato parece ter sido exatamente seguido (Flint et al., 1998).

A análise dos haplótipos β^{tal} mostrou que a mutação IVS-I-6 (T \rightarrow C) na população de Pernambuco apresentou uma forte associação com o haplótipo VI (94,4%), nenhum haplótipo VII foi associado a essa mutação, também descrito em outras populações (Efremov et al., 1994; Zahed et al., 2000).

A distribuição molecular nos 164 alelos β talassêmicos, mostrou que das 15 mutações identificadas, 4 corresponderam a 84,3% dos alelos β talassêmicos na população

de Pernambuco, nas seguintes proporções: 54,9% IVS-I-6 (T→C), 15,2% IVS-I-5 (G→C), 7,9% códon 39 (C→T) e 6,1% IVS-I-1 (G→A). A tabela 26 mostra a distribuição da talassemia β em diferentes regiões do país.

Tabela 26: Distribuição molecular das mutações mais frequentes da talassemia β no estado de São Paulo, Rio Grande do Sul e Pernambuco.

Mutações	Rib. Preto ¹	SP ²	Campinas ³	RS ⁴	Pernambuco ⁵
Cd 39 (C→T)	47,0%	64,0%	54,3%	50,9%	7,7%
IVS-I-110 (G→A)	15,0%	20,0%	18,3%	18,1%	3,0%
IVS-I-6 (T→C)	27,0%	7,0%	18,3%	9,5%	53,6%
IVS-I-1 (G→A)	---	6,0%	4,3%	12,9%	5,9%
IVS-I-5 (G→C)	---	---	---	---	14,9%
Outras	11,0%	3,0%	4,8%	8,6%	14,9%

1- Costa et al., 1990; 2- Martins et al., 1993; 3- Fonseca et al., 1998; 4- Reichert, 2006; 5- Presente estudo.

São poucos os estudos moleculares realizados no Brasil para talassemia β , sendo em sua maioria restrita ao estado de São Paulo. Nesse estado, segundo dados da ABRASTA - Associação Brasileira de Talassemia (www.abrasta.org.br), é onde estão localizados o maior número dos casos mais graves de talassemia.

Enquanto nas regiões Sudeste e Sul a doença tem origem predominantemente italiana, sobressaindo-se a mutação códon 39 que causa uma forma mais grave da doença, em Pernambuco a forma mais comum parece ter sido introduzida pelos portugueses, no período inicial da colonização. Podemos então deduzir que a talassemia em Pernambuco tende a ter um quadro clínico mais brando, devido à predominância da mutação β^{+leve} IVS-I-6 (T→C) (Araújo et al., 2003). Pode-se também observar que a mutação mediterrânea IVS-I-110 (G→A) apresenta uma alta frequência nos 3 estudos da regiões Sudeste e o no da região Sul, diferente do encontrado em Pernambuco. A mutação β^{+grave} IVS-I-5 (G→C) só tem sido descrita no estado de Pernambuco (Araújo et al., 2003).

A mutação IVS-I-6 (T→C) é uma mutação β^{+leve} e diversos estudos demonstram que ela condiciona quadros clínicos mais leves da talassemia (Costa et al., 1991; Waye et al., 1995; Ho et al., 1998; Araújo et al., 2002). Em homozigose, predominam os quadros de talassemia β intermediária (Efremov et al., 1993; Rund et al., 1997; Qatanani et al., 2000; El-Latif et al., 2002; Araújo et al., 2002), que são os quadros predominantes nos pacientes desse estudo. O genótipo mais comum nos pacientes com talassemia β homozigota foi o IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C), onde dos 47 casos analisados, 30 (63,8%) foram homozigotos para essa mutação β^{+leve} . Nas primeiras descrições dessa condição, em um extenso estudo realizado por Efremov et al. (1994), foi encontrado que homozigotos tinham uma forma clínica relativamente leve de talassemia intermediária e nenhum paciente necessitava de transfusões regulares. Eles apresentavam Hb média de 7,6g/dl, com Hb Fetal média de 9,2% e HbA₂ média de 6,7%. Por outro lado, Rund et al. (1997) estudando pacientes com talassemia intermediária de Israel, descreveu um fenótipo clínico muito mais variável. Em um extremo, nove pacientes apresentaram níveis de hemoglobina basal entre 10 e 11 g/dl, nenhum tinha sido esplenectomizado e raramente ou nunca necessitaram de transfusões. Em outro extremo, entretanto, nove pacientes tinham níveis de hemoglobina basal entre 6 e 7 g/dl, e eram esporadicamente transfundidos, mesmo tendo sido esplenectomizados. Esse grupo, mais tarde, apresentou retardo de crescimento, alterações ósseas pronunciadas, ausência de puberdade e uma evidência de sobrecarga de ferro.

Essa diversidade fenotípica nos pacientes homozigotos IVS-I-6 (T→C) de Pernambuco assemelha-se à descrita na literatura para as populações de Israel, Palestina, Líbano e Portugal (Rund et al., 1997; El-Latif et al., 2002; Qatanani et al., 2000; Efremov et al., 1994). Não encontramos relação entre os níveis de HbF e a apresentação clínica nos pacientes estudados. A variabilidade nos níveis de HbF encontrada em nossa casuística, sugere que outros fatores que não estejam associados ao *cluster* do gene da globina β possam ter um papel relevante na expressão do gene γ (Efremov et al., 1994). A identificação dos fatores para essa variabilidade pode indicar novas modalidades terapêuticas para esses pacientes (El-Latif et al., 2002).

A segunda mutação mais freqüente no estudo foi a IVS1-5 (G→C) previamente descrita no Brasil por Araújo et al, (2003). Essa mutação esteve presente em 15,2% dos alelos e é considerada como a de maior prevalência no subcontinente indiano (Tuzmen e

Schechter, 2001). Num estudo para diagnóstico pré-natal, nessa mesma região, realizado por Varawalla et al. (1991) a IVS1-5 (G→C) foi detectada em 38,3% dos alelos. Num outro estudo aparece em 57,0% dos portadores da talassemia maior e intermediária, sendo considerada como uma mutação grave com o aparecimento dos sintomas e necessidades transfusionais no primeiro ano de vida em 67,5% dos casos (Nadkarki et al., 2001). No Paquistão, Khan et al. (1998) encontraram a mutação IVS1-5 (G→C) em 37,7% dos alelos, evidenciando assim a grande frequência dessa mutação no Oriente.

Para definir as bases moleculares da talassemia β na Tailândia, Paquistão, Ceilão, Ilhas Maurício, Síria e Índia, foi realizado um estudo multicêntrico coordenado por John Old, do Weatherall Institute of Molecular Medicine, identificando a mutação IVS1-5 (G→C) nas seguintes proporções: 1% na Tailândia, 37% no Paquistão, 56% no Ceilão, 83% nas Ilhas Maurício, 0% na Síria e 30% na Índia (Old et al., 2001). Podemos até especular que as grandes proporções no Ceilão e nas Ilhas Maurício são também fruto do efeito fundador. No Sri Lanka essa mutação foi encontrada em 56,2% dos alelos talassêmicos (Fisher, 2003) e no Mediterrâneo essa mutação tem sido descrita, com baixa frequência, em povos libaneses (Zahed et al., 2000; Makhoul et al., 2005).

Não encontramos na literatura consultada registro de populações de indianos no estado de Pernambuco. Sabemos dos contatos e colônias portuguesas no oriente, como na Índia, em Goa (no subcontinente indiano), nas Ilhas Maurício e Ceilão, no oceano Índico, e em Macau e Timor Leste, no Pacífico. Esses contatos foram estabelecidos por Vasco da Gama antes do descobrimento do Brasil e alguns desses locais permaneceram como colônias portuguesas até o fim do século XVIII.

A mutação IVS-I-5 (G→C) é citada com frequência em Guadalupe, em 11,1% dos alelos (Romana et al., 1996) e na Jamaica, em 7,0% dos alelos (Donaldson et al., 2000). Ambos são países do Caribe de populações com mistura de ancestrais africanos, indianos e caucasianos, que tiveram colonização francesa e inglesa respectivamente, povos que, sabidamente, estabeleceram negócios com o porto do Recife durante longos períodos da história pernambucana (Lima, 1985). É possível que, com a abertura do porto do Recife ao comércio internacional no período de Maurício de Nassau (de 23 de janeiro de 1637 a 06 de maio de 1644) tenha havido alguma migração de povos orientais, já que era pensamento do Conde diversificar a agricultura pernambucana plantando especiarias da Índia (Lima,

1985). Nova abertura de portos aconteceu em 1808, com a chegada de D. João VI (Lima, 1895) e, com isso, novas oportunidades de imigração de povos do oriente e de outras partes do mundo.

Em estudos realizados na população indiana, a mutação IVS-I-5 (G→C) está fortemente associada ao haplótipo VII (Kazazian et al., 1984; Venkatesan et al., 1992; Varawalla et al., 1992). Na população libanesa (Zahed et al., 2000; Makhoul et al., 2005), na de Guadalupe (Romana et al., 1996), nas Ilhas Maurício (Kotea et al., 2000) e no Sri Lanka (Fisher et al., 2003) essa mutação também esteve associada ao haplótipo VII. Nesse estudo, a IVS-I-5 (G→C) esteve, quase que exclusivamente, ligada ao haplótipo I (88,0%) e nenhum haplótipo VII foi encontrado relacionado a ela, o que pode sugerir uma origem diferente para esta mutação no Brasil. No entanto, Kulozik et al. (1991), estudando pacientes com a interação S/ IVS-I-5 (G→C) do estado de Orissa (Índia) encontrou essa mutação ligada ao haplótipo I em 82,3% dos casos.

Os cursos clínico e laboratorial de 2 grupos de pacientes com doença HbS/β talassemia (S/IVSI-5 (G→C) e S/IVSI-6 (T→C)) que apresentavam quantidades similares de HbS e com diferença evidente nas suas quantidades de HbF e HbA, foram bastante variáveis.

Os dados apresentados na tabela 22 demonstram que o curso clínico dos pacientes com alta porcentagem de HbA é muito leve, enquanto o curso clínico dos pacientes com altos níveis de HbF é grave. É importante notar que a quantidade HbA+HbF não é estatisticamente diferente nos 2 grupos ($22,8 \pm 8,3$ e $28,1 \pm 1,8$). Não observamos outros fatores, tais como haplótipos ou genótipo alfa que possam interferir com a apresentação clínica dos pacientes. Clinicamente, os pacientes com a associação $\beta^S/\beta^{\text{tal IVS-I-5}}$ quando comparados ao grupo dos $\beta^S/\beta^{\text{tal IVS-I-6}}$, apresentaram maior gravidade durante o acompanhamento, com maior número de internações devido a crises de dor por vaso-oclusão, infecções e outras complicações agudas da doença falciforme; além disso, apresentaram maior incidência de litíase biliar, esplenectomia e necessidade de transfusões. Nossos resultados sugerem que a proteção contra a polimerização da HbS em pacientes com doença falciforme pode ser mais efetiva na presença de HbA quando comparada com quantidades similares de HbF.

O haplótipo II esteve fortemente associado à mutação β^0 39, enquanto a mutação IVS-I-1 (G→A) com o haplótipo V e a IVS-I-110 (G→A) com os haplótipo I, assim como nas populações mediterrâneas.

A mutação códon 30 (AGG→CGG) ou IVS-I (-2) (A→C) foi descrita uma única vez em paciente canadense portador do traço da talassemia β (Wayne et al., 2002). Essa mutação não leva a uma mudança de aminoácido (Arg), mas altera o sítio de *splicing*, assim como a mutação no códon 29 (GGC→GGT: Gly) descrita na população libanesa (Chehab et al., 1987). Entretanto, Wayne et al. (2002) não determinaram se a mutação códon 30 (AGG→CGG) abolia completamente ou não produção de cadeias β (β^0 ou β^+). Existe uma outra mutação β talassêmica no sítio *splicing* IVS-I (-2), descrita em pacientes de origem judaica, a códon 30 (AGG→GGG), que leva a troca do aminoácido arginina (Arg) por glicina (Gly), apresentando um padrão de alelo β^0 (Waye et al., 1998). Em nosso estudo essa mutação esteve presente em um paciente com quadro clínico de talassemia β intermediária (origem étnica desconhecida), em heterozigose composta com a mutação β^0 IVS-I-1 (G→A), e apresentava Hb Fetal: 72,2%, HbA: 24,7% e HbA₂: 3,1%; estes dados mostram que o fenótipo é β^+ para essa mutação, com produção de altos níveis de HbA. A mutação códon 30 (AGG→CGG) esteve em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo *XmnI* e associada com o haplótipo IX descrito pela primeira vez para essa mutação, assim como o descrito para uma outra mutação no mesmo códon (AGG→ACG) em outras populações (Zahed et al., 2000; Kotea et al., 2000).

A mutação rara descrita aqui e encontrada pela 1ª vez na população indiana, IVS-II-837 (T→G), cria um novo sítio de *splicing*, o qual pode ser preferencialmente utilizado. Porém, na literatura, o fenótipo (β^0 ou β^+) para essa mutação permanece indefinido (Varawalla et al., 1991; Vaz et al., 2000; Colah et al., 2004). Em nosso estudo esta mutação foi identificada em um garoto de origem indiana (bisavô proveniente da cidade de Goa, vindo para o Brasil em 1910) com S/ β talassemia, que apresentava HbS: 76,7%; Hb Fetal: 11,4%, HbA: 6,0% e HbA₂: 5,9%. Portanto, para essa mutação também foi possível determinar o fenótipo como β^+ , com baixos níveis de produção de HbA. A mutação IVS-II-837 (T→G) esteve associada ao haplótipo V, como descrito na população indiana (Varawalla et al., 1992).

A mutação na região promotora - 88 (C→T) descrita com alta frequência na população afro-descendente da América do Norte e Jamaica (Donaldson et al., 2000; Gonzalez-Redondo et al., 1991) foi encontrada em 2,4% dos alelos, frequência similar à encontrada na população de Guadalupe e Cuba (Muñiz et al., 2000; Romana et al., 1996). Essa mutação esteve relacionada com o haplótipo atípico [- - - + - +], diferente do encontrado em outras populações, onde foi associado ao haplótipo V (Varawalla, 1992; Zahed et al., 2000; Makhoul et al., 2005).

A mutação β^{+leve} -29 (A→G), localizada na região TATA box do promotor do gene β , é relativamente, a mais frequente em afro-descendentes (Romana et al., 1996; Donaldson et al., 2000; Gonzalez-Redondo et al., 1991; Muñiz et al., 2000) e o caso descrito aqui representa a 1ª descrição no Brasil. Essa mutação apresenta uma taxa elevada de ligação com o polimorfismo *XmnI* e está associada com o haplótipo IX (Gonzalez-Redondo et al., 1991), confirmados nesse estudo.

A mutação IVS-I-2 (T→C) tem alta frequência na população da Argélia (Bouhass et al., 1994), descrita também em negros americanos e em Guadalupe (Gonzalez-Redondo et al., 1991; Romana et al., 1996). No Brasil, nosso resultado representa a primeira descrição dessa mutação e está associada ao haplótipo atípico [- - - + +], diferente do encontrado em outros estudos (Gonzalez-Redondo et al., 1989; Gonçalves et al., 1994).

A mutação códon 106/107 (+G), que causa um *frameshift* promovendo uma terminação prematura no códon 139 (TAA) tem sido descrita em negros americanos (Gonzalez-Redondo et al., 1991). No Brasil ela foi identificada pela primeira vez e está neste trabalho associada ao haplótipo V, assim como descrito na Tunísia (Bibi et al., 2006).

O *frameshift* β^{12} (-C) provoca uma terminação prematura no códon 18 do gene β (TGA), levando a uma mutação do tipo β^0 ainda não previamente descrita. Essa mutação está presente em 3 irmãos com talassemia β maior, de uma família de origem étnica desconhecida, proveniente de Timbaúba-PE e está associada ao haplótipo I. A mutação β^0 IVSII-849 (A→G), observada no outro alelo, e identificada anteriormente em afro-americanos e população de Guadalupe e Cuba (Gonzalez-Redondo et al., 1991; Romana et al., 1996; Muñiz et al., 2000) altera o sítio acceptor de *splicing* localizado no IVS-II do gene β e sendo esta sua primeira detecção no Brasil. Essa mutação está presente em 3,0% dos

alelos e todos os pacientes estiveram relacionadas com mesmo padrão de haplótipo atípico [- - - + - +], assim como descrito na literatura (Atweh et al., 1985).

A mutação IVS-I-5 (G→A), descrita na população da Argélia e de Guadalupe (Lapoumeroulie et al., 1986; Romana et al., 1996), esteve presente em 2,4% dos alelos e associada com o haplótipo V, o mesmo haplótipo descrito nas populações citadas acima.

A mutação poli-A (T→C) tem alta frequência em jamaicanos, também encontrada em negros americanos (Donaldson et al., 2000; Gonzalez-Redondo et al., 1991), e foi identificada pela 1ª vez no Brasil e esteve associada ao haplótipo V, como descrito na literatura (Orkin et al., 1985).

Os resultados dos haplótipos β^S nos pacientes com S/ β talassemia foram semelhantes aos descritos por Bezerra et al, (2007) estudando pacientes com doença falciforme provenientes da triagem neonatal de Pernambuco, exceto pelo achado do haplótipo Senegal, descrito pela primeira vez nesse estado.

O tipo de cromossomo β^S , caracterizado por haplótipo específico, parece não ter um papel importante na alteração dos dados hematológicos e composição da Hb em pacientes com S/ β talassemia (Gonzalez-Redondo et al., 1988).

Esses resultados, em seu conjunto, revelam a heterogeneidade das bases moleculares da talassemia β nas diferentes regiões do país. No Brasil, embora a composição étnica da população seja heterogênea, as mutações mais comuns são de origem Mediterrânea. No entanto, Pernambuco pode ser considerado uma exceção já que cerca de 15,0% da população talassêmica possui mutações de origem asiática e 11,2% de origem africana. A diversidade de mutações e suas respectivas frequências diferem do encontrado em outras populações brasileiras já estudadas, como a do Sudeste, onde 4 mutações respondem por cerca de 97% dos casos e a mutação predominante é a β^{039} (C→T) (Fonseca et al., 1998). Esta é maior prevalência da mutação β^+ IVS-I-5 (G→C) encontrada no Brasil.

Em muitos grupos populacionais, o fator contribuinte mais importante para uma apresentação clínica leve em homocigotos para talassemia β e heterocigotos compostos é a mutação talassêmica $\beta^{+ \text{leve}}$ (Forget, 2001). E em Pernambuco, o principal fator responsável pelo quadro clínico intermediário é a alta frequência da mutação $\beta^{+ \text{leve}}$ IVS-I-6 (T→C),

onde dos 36 casos de talassemia β intermediária, 88,8% apresentavam pelo menos 1 alelo IVS-I-6 (T→C).

O efeito modulador da talassemia α pode não ser evidente nesse grupo devido a baixa frequência da talassemia α associado aos diversos genótipos β .

A gravidade da talassemia β reflete os níveis de desequilíbrio entre as cadeias globínicas e o excesso de cadeias α com seus efeitos deletérios nos precursores eritróides. Esse desequilíbrio pode ser geneticamente alterado por dois fatores modificadores secundários: variação na quantidade de cadeias globínicas α e variação na produção de cadeias γ (Cao, 2002; Thein, 2004).

Os pacientes com o genótipo IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-5 (G→C) apresentam talassemia β maior, exceto em paciente com a deleção $-\alpha^{3.7\text{ kb}}$ em heterozigose, que tem um quadro clínico de talassemia β intermediária. Esse paciente tem 14 anos de idade e foi diagnosticado aos 12 anos, tendo recebido apenas 8 transfusões, apresentando crescimento e desenvolvimento normais. O outro paciente que apresentou a deleção $-\alpha^{3.7\text{ kb}}$ em heterozigose apresentou o genótipo Códon 39 (C→T) / Códon 39 (C→T) e tinha um quadro clínico de talassemia β maior. Esses resultados condizem com os dados da literatura (Galanello e Cao, 1998; Thein, 2005), no qual uma única deleção ($-\alpha/\alpha$) foi capaz de melhorar o quadro clínico do paciente com o fenótipo $\beta^{+ \text{ leve}} / \beta^{+ \text{ grave}}$, enquanto no paciente β^0 / β^0 uma única deleção ($-\alpha/\alpha$) não tem efeito significativo no quadro clínico.

A presença da triplicação do gene α no paciente HBB*S / IVS-I-6 (T→C) parece não ter muito efeito no quadro clínico e laboratorial do paciente em relação a outros pacientes que apresentaram o mesmo genótipo $\beta^S / \beta^{\text{tal}}$ e sem a presença de genes α extras. Esse paciente foi diagnosticado aos 12 anos de idade, apresentando Hb basal de 12,8 g/dl, HbS: 65,0%, HbA: 27,9%, Hb Fetal: 2,7% e HbA₂:4,4%. Ou seja, em pacientes com S/ β talassemia que apresentaram mutações $\beta^{+ \text{ leve}}$, o excesso de genes α , aparentemente não tem muito efeito na clínica, enquanto nos pacientes com mutações $\beta^{+ \text{ grave}}$ ou β^0 tem efeito com um curso clínico mais grave. Todos os pacientes que apresentaram o polimorfismo *XmnI* tinham um fenótipo intermediário. Esse polimorfismo esteve ligado às mutações $\beta^{+ \text{ leve}}$ IVS-I-6 (T→C), códon 30 (A→C) e - 29 (A→G).

Na hemoglobina instável, Hb Caruaru ($\beta 122 \text{ Fen} \rightarrow \text{Ser}$), descrita aqui pela 1ª vez, o aminoácido que ocupa a posição 122 da cadeia β participa dos contatos α_1/β_1 . Embora duas outras variantes com substituições na mesma posição, mas com outro tipo de substituição, tenham sido encontradas em indivíduos sem alterações hematológicas [Hb Bushey ($\beta 122 \text{ Fen-Leu}$) e Hb Casablanca ($\beta 65 \text{ Lis-Met}$; $\beta 122 \text{ Fen-Leu}$)] (Wajcman et al., 2000). A incorporação de serina (resíduo hidrofílico) no lugar da fenilalanina (resíduo hidrofóbico) pode ser responsável pela instabilidade estrutural observada na Hb Caruaru. Tudo indica que essa mutação pode ser um possível caso de mutação de linhagem germinativa.

A hemoglobina Olinda, uma variante causada pela deleção de 12 pb no gene da globina β , é composta por uma globina β menor que a normal e muito instável, como consequência da remoção de 4 aminoácidos (-Glu-Val-Gly-Gly-) localizados nas posições 22 a 25 da cadeia β . Essa mudança do código de leitura, trouxe os resíduos 23 e 24 antes externos, para dentro da molécula da Hb (Glu-Ala-Leu-Gly). Substituições nessas posições, especialmente no códon 24, que está próximo ao contato com a hélice E, leva à anemia hemolítica e à produção de variantes com estabilidade e função alteradas. Provavelmente, essa hemoglobina não será transmitida para outros descendentes, pois a paciente é filha única e já fez ligação das trompas, e seu único filho não herdou a Hb Olinda.

O fenótipo da talassemia β também pode ser modificado pela ação de fatores genéticos não ligados ao *cluster* dos genes globínicos. Um dos mais reconhecidos fatores moduladores pertencente a essa categoria é a co-herança alterações moleculares associadas à Síndrome de Gilbert, que podem está associadas ao desenvolvimento de icterícia mais intensa e cálculos biliares (Cao, 2002, Thein, 2005).

Nesse estudo, a análise do polimorfismo *UGT1A1* mostrou que pacientes do Grupo I [homozigotos $(\text{TA})_6 / (\text{TA})_6$ e heterozigotos com pelo menos um alelo $(\text{TA})_5$] e Grupo II [heterozigotos $(\text{TA})_6 / (\text{TA})_7$ e $(\text{TA})_6 / (\text{TA})_8$], não mostraram diferença estatisticamente significante nos níveis de bilirrubina não-conjugada e tendência a desenvolver colelitíase. Os pacientes do Grupo III [homozigotos $(\text{TA})_7 / (\text{TA})_7$ e heterozigotos $(\text{TA})_7 / (\text{TA})_8$] tiveram maior tendência a desenvolver colelitíase do que os dos grupos I e II, embora esses resultados não sejam estatisticamente significantes. Estes dados corroboram com resultados prévios da literatura, sugerindo que pacientes com

genótipos (TA)₇ / (TA)₇ e (TA)₇ / (TA)₈ parecem ter maior probabilidade de desenvolver colelitíase (Galanello et al., 1999; Galanello et al., 2001; Charr et al., 2005; Fertrin et al., 2003). Os nossos resultados podem indicar que a coexistência da Síndrome de Gilbert em pacientes com anemias hemolíticas pode ser a causa dos valores elevados da bilirrubina não conjugada, reduzindo a possibilidade de hemólise excessiva nesses pacientes (Kaloutychou et al., 2003; Premawardhena et al., 2001; Galanello et al., 1999). A genotipagem do *UGT1A1* é, portanto, uma ferramenta potencial para identificar indivíduos homozigotos para talassemia β e S/ β -talassêmicos com maior risco de colelitíase e necessidade de monitoramento clínico. Além de representar um modelo que auxilia na compreensão dos efeitos de genes modificadores secundários na variabilidade clínica dessas doenças monogênicas (Galanello et al., 1999; Charr et al., 2005; Fertrin et al., 2003).

Conclusões

- Os resultados revelam a heterogeneidade das bases moleculares da talassemia β nas diferentes regiões do país;
- Este trabalho representa o maior número de homozigotos β^+ IVS-I-6 (T→C) estudados em uma única população até o momento;
- Encontramos na população estudada grande homogeneidade na distribuição das mutações e respectivos haplótipos. A determinação do haplótipo pode servir como ferramenta complementar para o diagnóstico molecular da talassemia β ;
- Os haplótipos β^{Tal} confirmam a heterogeneidade e origem histórica da população de Pernambuco, com evidências de alguns haplótipos comuns e raros de origem mediterrânea, africana e asiática;
- Em seu conjunto, estes tais mostram que os pacientes com talassemia β em Pernambuco apresentam perfis genéticos e clínicos distintos daqueles observados no Sudeste do Brasil, onde predomina a mutação talassêmica β^0 39 (C→T);
- Pacientes com doença falciforme e que apresentaram níveis de HbA elevados cursaram com quadro clínico significativamente mais brando do que os que tiveram Hb Fetal elevada, sendo possível especular que uma terapia objetivando induzir a produção de HbA ou “transfundir”, mesmo em quantidades pequenas, possa vir a ser mais efetiva no controle da doença falciforme do que o aumento da produção de HbF;
- O efeito do defeito genético do metabolismo da bilirrubina nas manifestações clínicas das síndromes talassêmicas é um exemplo que auxilia a compreender o papel de genes modificadores secundários na variabilidade clínica de uma doença monogênica.

Tomadas em conjunto, este estudo representa a análise mais abrangente da população de pacientes talassêmicos realizado no Brasil. Os resultados ressaltam a grande heterogeneidade da apresentação dessa doença em nosso país e indicam a necessidade de estudos em outras regiões do país

Referências Bibliográficas

ADAMS, R.J.; KUTLAR, A.; MICKIE, V.; CARL, E., NICHOLS, F.T.; LIU, J.C.; MICKIE, K.; CLARY, A. Alpha thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**. v. 45, p. 279-282, 1994.

ALMEIDA, M.I.M.; SILVA, I.S.; BORBA, M.F.A.; PEREIRA, C.O.; BEZERRA, A.C.R.; LIMA, M.C.T.N. Incidência das Hemoglobinopatias mais Frequentes Diagnosticadas no Laboratório Municipal de Saúde Pública do Recife no Período de Novembro 2002 a Dezembro 2004. **Anais do 39º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial**, 2005.

ANTONARAKIS, S.E.; BOEHM, C.D.; SERJEANT, G.R.; THEISEN, C.E.; DOVER, G.J.; KASAZIAN JUNIOR, H.H. Origin of the β^S globin in Blacks: the contribution of recurrent mutation or gene conversion or both. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 81, p.853-856, 1984.

AONO, S.; ADACHI, Y.; UYAMA, E.; YAMADA, Y.; KEINO, H.; NANNO, T.; KOIWAI, O.; SATO, H.. Analysis of genes for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in Gilbert's syndrome. **Lancet**. v. 345, p.958-959, 1995.

ARAÚJO, A.S.; SILVA Jr., W.A.; LEÃO, S.A.C.; BANDEIRA, F.M.G.C.; PETROU, M.; MODELL, B.; ZAGO, M.A. A Different Molecular Pattern of β -Thalassemia Mutations in Northeast Brazil. **Hemoglobin**. v.27, n. 4, p. 211-217, 2003.

ATWEH, G.F.; ANAGNOU, N.P.; SHEARIN, J.; FORGET, B.G.; KAUFMAN, R.E. β -Thalassemia Resulting from a Single Nucleotide Substitution in an Acceptor Slice Site. **Nucleic Acids Res.** v. 13, p. 777, 1985.

BANDEIRA, F.M.G.C.; LEAL, M.C.; SOUZA, R.R.; FURTADO, V.C.; GOMES, Y.M.; MARQUES, M. Características de recém-nascidos portadores de hemoglobinas S detectados através de triagem de sangue de cordão umbilical. **J Pediatr**. v. 75, p. 167-171, 1999.

MARINS, C.S.; RAMALHO, A.S.; SONATI, M.F.; GONÇALVES, M.S.; COSTA, F.F. Molecular characterization of beta-thalassemia heterozygotes in Brazil. **Journal of Medical Genetics**. v. 30, p. 797-798, 1993.

BEZERRA, M.A.C.; SANTOS, M.N.N.; ARAÚJO, A.S.; GOMES, Y.M.; ABATH, F.G.C.; BANDEIRA, F.M.G.C. Molecular variations linked to the grouping of β - and α -globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the state of Pernambuco, Brazil. **Hemoglobin**. v.31, n. 1, p. 1-6, 2007 (*in press*).

BIBI, A.; MESSAOUD, T.; BELDJORD, C.; FATTOUM, S. Detection of two rare beta-thalassemia alleles found in the Tunisian population: codon 47 (+A) and codons 106/107 (+G). **Hemoglobin**, v.30, n. 4, p. 437-447, 2006.

BOSMA, P.J.; CHOWDHURY, J.R.; BAKKER, C.; GANTLA, S.; BOER, A.; OOTRA, B.A.; LINDHOUT, D.; TYTGAT, G.N.J.; JANSEN, P.L.M.; ELFERINK, R.P.J.O.; CHOWDHURY, N.R. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. **N Engl J Med**. p. 1171-1175, 1995.

BOUHASS, R.; PERRIN, P.; TRABUCHET, G. The spectrum of β -thalassemia mutations in Oran region of Algeria. **Hemoglobin**. v.18, p. 211-219, 1994.

BUNN, H.F.; FORGET, B.G. Molecular Genetics and Biosynthesis of Hemoglobin. In: BUNN, H.F.; FORGET, B.G. **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. 1st edition. Philadelphia, P.A, USA, Saunders Company. 1986, p. 169-222.

CAMASCHELLA, C.; CAPPELLINI, M.D. Thalassemia intermedia. **Haematologica**, v. 80, p. 58-78, 1995.

CAO, A.; SABA, L.; GALANELLO, R.; ROSATELLI, M.C. Molecular diagnosis and carrier screening for β -thalassemia. **JAMA**. v. 278, p. 1273-1277, 1997.

CAO, A.; GALANELLO, R.; ROSATELLI, M.C. Genotype-phenotype correlations in β -thalassemias. **Blood Reviews**. v.8, p.1-12, 1994.

CAO, A. Phenotype-Genotype Relationships in Mendelian Disorders: the Example of β -Thalassemsias. **Italian Journal of Pediatrics**. v. 28, n. 6, p. 440-452, 2002.

CAPPELLINI, M.D.; COMINO, A. In: **Clinica e Terapia della Talassemia**. Società Editrice Europea di Nicodemo Maggiulli & C., Firenze, Itália. Cap.3, p. 61-94, 2000.

CHAAR, V.; KÉCLARD, L.; DIARA, J.P.; LETURDU, C.; ELION, J.; KRISHAMOORTHY, R.; CLAYTON, J.; ROMANA, M. Association of *UGT1A1* Polymorphism with Prevalence and Age at Onset of Colelithiasis in Sickle Cell Anemia. **Haematologica**. v. 90, p. 188-193, 2005.

CHEHAB, F.F.; KALOUSTIAN, V.D.; KHOURI, F.P.; DEEB, S.S.; KAN, Y.W. The molecular basis of β -thalassemia in Lebanon: Application to prenatal diagnosis. **Blood**. v. 69, n. 4, p. 1141-1145, 1987.

CHONG, S.S.; BOEHM, C.D.; HIGGS, D.R.; CUTTING, G.R. Single-Tube Multiplex-PCR Screen for Common Deletional Determinants of α -Thalassemia. **Blood**. v. 95, n. 1, p. 360-362, 2000.

COLAH, R.; NADKARNI, A.; GORAKSHAKAR, A.; PHANASGAONKAR, S.; SURVE, R.; SUBRAMANIAM, P.G.; BONDGE, N.; PUJARI, K.; GHOSH, K.; MONHANTY, D. Impact of β globin gene mutations on the clinical phenotype of β thalassemia in India. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**. v. 33, p. 153-157, 2004.

COSTA, F.F.; TAVELA, M.H.; ZAGO, M.A. Molecular basis of beta-thalassemia in Brazil. **Blood**. v. 76, n. 10, 1990.

COSTA, F.F.; TAVELLA, M.H., ZAGO, M.A. β -Thalassemia Intermedia and IVS-1 NT6 Homozygosity in Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.24, p. 157-161, 1991.

COSTA, F.F. Anemia Falciforme. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia Fundamentos e Prática**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2004, Cap. 30, p. 289-308.

DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. **Practical Haematology**. 8th edition. Churchill, Livingstone, Hong Kong, London, Madrid, Melbourne, New York and Tokyo. 1995.

DODÉ, C.; KRISHNAMOORTHY, R.; LAMB, J & ROCHETE, J. Rapid analysis of $-\alpha^{3.7}$ thalassemia and $\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$ by enzymatic amplification analysis. **British Journal of Haematology**. v. 82, p. 105-111, 1992.

DONALDSON, A.; OLD, J.; FISHER, C.; SERJEANT, B.E.; SERJEANT, G.R. Jamaican $S\beta^+$ -thalassemia: mutations and haematology. **British Journal of Hematology**. v. 108, p. 290-294, 2000.

EFREMOV, D.G.; DIMOVSKI, A.J.; BAYSAL, E.; YE, Z.; ADEKILE, A.D.; RIBEIRO, M.L.S.; SCHILIRO, G.; ALTAY, Ç.; GÜRGEY, A.; EFREMOV, G.D.; HUISMAN, T.H.J. Possible Factors Influencing the Haemoglobin and Fetal Haemoglobin Levels in Patients with β Talassaemia due to a Homozygosity for the IVS-I-6 (T \rightarrow C) Mutation. **British Journal of Hematology**, v.86, p.824-830, 1994.

EL-LATIF, M.A.; FILON, D.; RUND, D.; OPPENHEIM, A.; KANAAN, M. The β^+ -IVS-I-6 (T→C) mutation accounts for half of the thalassemia chromosomes in the Palestinian populations of the mountain regions. **Hemoglobin**, v.26, n.1, p.33-40, 2002.

FAUTINO, P.; OSÓRIO-ALMEIDA, L.; BARBOT, J.; ESPÍRITO SANTO, D.; GONÇALVES, J.; RAMÃO, L.; MARTINS, M.C.; MARQUES, M.M. & LAVINHA, J. Novel promotor and splice junction defects add to the genetic, clinical or geographic heterogeneity of β -thalassemia in the Portuguese population. **Human Genetics**. v. 89, p. 573-576, 1992.

FERTRIN, K.Y.; MELO, M.B.; ASSIS, A.M.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. UDP-Glucuronosyltransferase 1 Gene Promoter Polymorphism is Associated with Increased Serum Bilirubin Levels and Cholecystectomy in Patients with Sickle Cell Anemia. **Clinical Genetics**. v. 64, p. 160-162, 2003.

FISHER, C.A.; PREMAWARDHENA, A.; SILVA, S.; PERERA, G.; RAJAPAKSA, S.; OLIVIERI, N.A.; OLD, J.M.; WEATHERALL, D.J. The Molecular Basis for the Thalassaemia in Sri Lanka. **British Journal of Haematology**. v. 121, p. 662-671, 2003.

FLINT, J.; HARDING, R.M.; BOYCE, A.J. CLEGG, J.B. The population genetics of the haemoglobinopathies. In: RODGERS, G.P. **Baillière's Clinical Haematology**. London: Bailliere Tindall, 1998, v.11, p. 1-52.

FREYRE, G. **Casa-grande & Senzala**. Ed. Record. 34 ed. Rio de Janeiro, 1992. 464p.

FONSECA, S.F.; KERBAUY, J.; ESCRIVÃO, C.; FIGUEIREDO, M.S.; CANCADO, R.; ARRUDA, V.R.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. Genetic Analysis of β -Thalassemia Major and β -Thalassemia Intermedia in Brazil. **Hemoglobin**. v. 22, n. 3, p. 197-207, 1998.

FORGET, B.G. Molecular Mechanisms of β Thalassemia. In: STEINBERG, M.H.;

FORGET, B.G.; HIGGS, D.R.; NAGEL, R.N. **Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management**. Cambridge University Press: NY, USA, 2001, Cap.12, p. 252-276.

GALANELLO, R.; CAO, A. Relationship Between Genotype and Phenotype. **Annals New York of Sciences**. v. 850, p. 325-333, 1998.

GALANELLO, R.; CIPOLLINA, M.D.; DESSI, C.; GIAGU, N.; LAI, E.; CAO, A. Co-inheritet Gilbert's syndrome: a factor determining hyperbilirubinemia in homozygous β -thalassaemia. **Haematologica**. v. 84, p. 103-105, 1999.

GALANELLO, R.; PIRAS, S.; BARELLA, S.; LEONI, G.B.; CIPOLLINA, M.D. PERSEU, L.; CAO, A. Cholelithiasis and Gilbert's Syndrome in Homozygous β -Thalassaemia. **British Journal of Haematology**. v. 115, p. 926-928, 2001.

GONÇALVES, G.; FAUSTINO, P.; LAVINHA, J. An african origin for an "american black" β^0 -thalassemia mutation? **British Journal of Hematology**. v. 46, n. 4, p. 373-374, 1994.

GONZALEZ-REDONDO, J.M.; KUTLAR, F.; KUTLAR, A.; STOMING, T.A.; DE PABLOS, J.M.; HUISMAN, T.H.J. Severe Hb S(C)- β^+ -thalassemia: different mutations are associated with different levels of normal Hb A. **British Journal of Hematology**. v. 70, p. 85-89, 1988.

GONZALEZ-REDONDO, J.M.; STOMING, T.A.; KUTLAR, F.; KUTLAR, A.; MCKIE, V.C.; MCKIE, K.M.; HUISMAN, T.H.J. Severe Hb S- β^0 -thalassemia with a T→C substitution in the donor splice site of the first intron of the β -globin gene. **British Journal of Hematology**. v. 71, p. 113-117, 1989.

GONZALEZ-REDONDO, J.M.; KUTLAR, A.; KUTLAR, F.; MCKIE, V.C.; BAYSAL, E.; HUISMAN, T.H. Molecular Characterization of Hb S(C) β -thalassemia in American Blacks. **American Journal of Hematology**. v. 38, p. 9-14, 1991.

HIGGS, D.R. α -Thalassaemia. In: **Baillière`s Clinical Haematology**. 1993, v. 6, n. 1, p. 117-150.

HO, P.J.; HALL, G.W.; LUO, L.Y.; WEATHERALL, D.J.; THEIN, S.L. β -thalassaemia intermedia: is it possible consistently to predict phenotype from genotype? **British Journal of Hematology**. v. 100, p. 70-78, 1998.

KALOTYCHOU, V.; ANTONATOU, K.; TZANETEA, R.; TERPOS, E.; LOUKOPOULOS, D.; ROMBOS, Y. Analysis of the A(AT)_nTAA Configuration in the Promoter Region of the UGT1 A1 Gene in Greek Patients with Thalassemia Intermedia and Sickle Cell Disease. **Blood Cells, Molecules and Diseases**. v. 31, p. 38-42, 2003.

KATTAMIS, A.C.; CAMASCHELLA, C.; SIVERA, P.; SURREY, S. & FORTINA, P. Human α -Thalassemia Syndromes: Detection of Molecular Defects. **American Journal of Hematology**. v. 53, p. 81-91, 1996.

KAZAZIAN, H.H.; ORKIN, S.H.; ANTONARAKIS, S.E.; SEXTON, J.P.; BOEHM, C.D.; GOFF, S.C.; WABER, P.G. Molecular Characterization of Seven β -Thalassemia Mutations in Asian Indians. **The EMBO Journal**. v. 3, n. 3, p. 593-596, 1984.

KHAN, S.N.; RIAZUDDIN, S. Molecular Characterization of Beta-Thalassemia in Pakistan. **Hemoglobin**. v. 22, n. 4, p. 333-345, 1998.

KOTEVA, N.; RAMASAWMY, R.; LU, C.Y.; FA, N.S.; GERARD, N.; BEESON, S.; DUCROCQ, R.; SURRUN, S.K.; NAGEL, R.L.; KRISHNAMOORTHY, R. Spectrum of β thalassemia mutations and their linkage to β -globin gene haplotypes in the Indo-Mauritians. **American Journal Hematology**. v. 63, p.11-15, 2000.

KULOZIK, A.E.; BAIL, S.; KAR, B.C.; SERJEANT, B.E.; SERJEANT G.E. Sickle Cell- β^+ Thalassaemia in Orissa State, India. **British journal of Haematology**. v. 77, p. 215-220, 1991.

LAPOUMEROULIE, C.; PAGNIER, J.; BANK, A.; LABIE, D.; KRISHNAMOORTHY, R. β thalassemia due to a novel mutation in IVS 1 sequence donor site consensus sequence creating a restriction site. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 139, p. 709-713, 1986.

LAPOUMÉROULIE, C.; DUNDA, O.; DUCROCQ, R.; et al. A novel sickle gene of yet another origin in Africa: the cameroon type. **Human Genetics**. v. 89, p. 333-337, 1992.

LIMA, M.O. **Pernambuco seu desenvolvimento histórico**. Ed. Massangana, 3 ed. Recife, 1895. p.322.

MAKHOUL, N.J.; WELLS, R.S.; KASPAR, H.; SHBAKLO, H.; TAHER, A.; CHAKAR, N.; ZALLOUA, P.A. Genetic heterogeneity of beta thalassemia in Lebanon reflects historic and recent population migration. **Annals of Human Genetics**. v. 65, p. 55-66, 2005.

MEARS, J.G.; LACHMAN, H.M.; LABIE, D.; NAGEL, R.L. Alpha-thalassemia is related to prolonged survival in sickle cell anemia. **Blood**. v. 62, p. 286-290, 1983.

MELO E.C. **Uma Nova Lusitânia**. Ed. SENAC São Paulo. São Paulo, 2000. p.363.

MIRANDA, S.R.P.; FONSECA, S.F.; FIGUEIREDO, M.S.; GROTTTO, H.Z.W.; KIMURA, E.M.; SAAD, S.T.O. & COSTA, F.F. Hb Köln [$\alpha 2\beta 298$ (FG5) Val \rightarrow Met] identified by DNA analysis in a Brazilian family. **Brazilian Journal of Genetics**. v. 20, p. 745-748, 1997.

MONAGAN, G.; RYAN, M.; SEDDON, R.; HUME, R.; BURCHELL, B. Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promotor and Gilbert's syndrome. **Lancet**. v. 347, p. 578-581, 1996.

MUÑIZ, A.; MARTINEZ, G.; LAVINHA, J.; PACHECO, P. β -thalassemia in Cubans: Novel allele increases the genetic diversity at the HBB locus in the Caribbean. **American Journal of Hematology**. v. 64, p. 7-14, 2000.

NADKARNI, A.; GORAKSHAKAR, A.C.; LU, C.Y.; KRISHNAMOORTHY, R.; GHOSH, K., COLAH, R.; MOHANTY, D. Molecular Pathogenesis and Clinical Variability of β -Thalassemia Syndromes Among Indians. **American Journal of Hematology**. v. 68, p. 75-80, 2001.

NAGEL, R.L. The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic, and anthropological consequences. **Einstein Q J Biol Med**. v. 2, p. 53-62, 1984.

NAGEL, R.L.; STEINBERG, M.H. Genetics of the β^S gene: origins, genetic epidemiology, and epistasis in sickle cell anemia. In: STEINBERG, M.H.; FORGET, B.G.; HIGGS, D.R.; NAGEL, R.L. **Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Magement**. Cambridge University Press: NY, USA, 2001, Cap. 26, p. 711-755.

OLD, J.M.; KHAN, S.N.; VERMA, I.; FUCHAROEN, S.; KLEANTHOUS, M.; IOANNOU, P.; KOTEA, N.; FISHER, C.; RIAZUDDIN, S.; SAXENA, R.; WINICHAGOON, P.; KYRIACOU, K.; AL-QUOBAILI, F.; KHAN, B. A multi-center study in order to further define the molecular basis of β -thalassemia in Thailand, Pakistan, Sri Lanka, Mauritius, Syria, and India, and to develop a simple molecular diagnostic strategy by amplification refractory mutations system polymerase chain reaction. **Hemoglobin**. v.25, n.4, p.397-407, 2001.

OLIVIERI, N.F. The beta-thalassemias. **New England Journal of Medical**. v. 341, p. 99-109, 1999.

OLIVIERI, N.F.; WEATHERALL, D.J. Clinical Aspects of β Thalassemia. In: STEINBERG, M.H.; FORGET, B.G.; HIGGS, D.R.; NAGEL, R.N. **Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management**. Cambridge University Press: NY, USA, 2001, Cap.13, p. 277-341.

ORKIN, S.H.; KAZAZIAN JR., H.H.; ANTONARAKIS, S.E.; GOFF, S.C.; BOEHM, C.D.; SEXTON, J.P.; WALBER, P.G. & GIARDINA, P.J.V. Linkage of β -thalassemia mutations and β -globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human β -globin gene cluster. **Nature**. v. 296, p. 627-631, 1982.

ORKIN, S.H.; CHENG, T.C.; ANTONORAKIS, S.E.; KAZAZIAN, H.H. Thalassemia due a mutation in the cleavage-polyadenylation signal of the human β globin gene. **The EMBO Journal**. v. 4, p. 453-456, 1985.

PAGNIER, J.; MEARS, G.; DUNDA-BELKHODJA, O.; SCHAEFER-REGO, K.E.; BELDJORD, C.; NAGEL, R.L.; LABIE, D. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in África. **Proc. Natl. Acad. Sci**. v. 81, p. 1771-1773, 1984.

POWARS, D.R. β^S gene cluster haplotypes in sickle cell anemia: clinical and hematologic features. **Hematol. Oncol. Clin**. v. 5, p. 475-493, 1991.

PREMAWARDHENA, A.; FISHER, C.A.; FATHIU, F.; DE SILVA, S.; PERERA, W.; PETO, T.E.A.; OLIVIERI, N.F.; WEATHERALL, D.J. Genetic Determinants of Jaundice and Gallstones in Haemoglobin E β Thalassaemia. **The Lancet**. v. 357, p. 1945-1946, 2001.

QATANANI, M.; TAHER, A.; KOUSSA, S.; NAAMAN, R.; FISHER, C.; RUGLESS, M.; OLD, J.; ZAHED, L. β -Thalassaemia Intermedia in Lebanon. **European Journal of Haematology**. v. 64, p. 237-244, 2000.

RAHGOZAR, S.; POORFATHOLLAH, A.A.; MOAFI, A.R.; OLD, J.M. β^S gene in Central Iran is in linkage disequilibrium with the Indian-Arab haplotype. **American Journal of Hematology**. v. 65, p.192-195, 2000.

RAMALHO, A.S. Investigação genético-epidemiológica das talassemias beta e delta-beta no Estado de São Paulo. **Rev Paul Med**. v. 88, p. 68, 1976.

RAMALHO, A.S.; TEIXEIRA, R.C.; TEIXEIRA, P.A. Genética e saúde pública no Brasil: Os programas comunitários de hemoglobinopatias hereditárias. **Ann. Acad. Nac. Med.** v. 156, n.1, p. 13-18, 1996.

RAMALHO, A.S.; SILVA, R.B.P.; TEIXEIRA, R.C.; COMPRI, M.B. - Hemoglobin screening: response of a Brazilian community to optional programs. **Caderno de Saúde Pública.** v. 15, p. 591-595, 1999.

REICHERT, V.C.D. Identificação de mutações para beta talassemia em uma população do extremo sul do Brasil [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre (RS): **Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Ciências Médicas**, 2006.

RIBEIRO, M.L.; GONÇALVES, P.; CUNHA, E.; BENTO, C.; ALMEIDA, H.; PEREIRA, J.; NUNEZ, G.M.; TAMAGNINI, G.P. Genetic heterogeneity of β -thalassemia in populations of the Iberian peninsula. **Hemoglobin.** v.21, n.3, p.261-269, 1997.

ROMANA, M.; KECLARD, L.; GUILLEMIN, G.; LAVOCAT, E.; SAINT-MARTIN, C.; BERCHEL, C.; MÉRAULT, G. Molecular characterization of β -thalassemia mutations in Guadalupe. **American Journal of Hematology.** v. 53, p. 228-233, 1996.

RUND, D.; ORON-KARNI, V.; FILON, D.; GOLDFARB, A.; RACHMILEWITZ, E.; OPPENHEIM, A. Genetic Analysis of β -Thalassemia Intermedia in Israel: Diversity of Mechanisms and Unpredictability of Phenotype. **American Journal of Hematology.** v. 54, p. 16-22, 1997.

SAIKI, R.K. The desing and optimization of the PCR. In: ERLICH, H.A. **PCR technology - Principles and applications for DNA amplification.** New York: Oxford University: Ty Press. p. 7-16, 1992.

SARNAIK, S.A.; BALLAS, S.K. Molecular characteristics of pediatric patients with sickle cell anemia and stroke. **American Journal of Hematology.** v.67, n.3, p.179-182, 2001.

STEINBERG, M.H.; EMBURY, S.H. α -Thalassemia in blacks: Genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. **Blood**. v. 68, p. 985-990, 1986.

SUTTON, M.; BOUHASSIRA, E. E.; NAGEL, R.L. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. **American Journal of Hematology**. v. 32, p. 66-69, 1989.

TAHER, A.; ISMA`EEL, H.; CAPPELLINI, M.D. Thalassemia Intermedia: Revisited. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**. v. 37, p. 12-20, 2006.

TAMAGNINI, G.P.; LOPES, M.C.; CASTANHEIRA, M.E.; WAINSCOAT, J.S. β thalassaemia – Portuguese type: clinical, haematological and molecular studies of a newly defined form of β thalassaemia. **British Journal of Haematology**. v.54, p. 189-200, 1983.

Thalassemia International Federation. **Guidelines for the clinical management of thalassemia**. – TIF, 2000.

THEIN, S.L. β -Thalassaemia. In: RODGERS, G.P. **Baillière's Clinical Haematology**. London: Bailliere Tindall, 1998, v.11, p. 91-126.

THEIN, S. L. Genetic insights into the clinical diversity of β thalassemia. **British Journal of Haematology**. v. 124, p. 264-274, 2004.

THEIN, S. L. Genetic Modifiers of β -Thalassemia. **Haematologica**. v. 90, p. 649-660, 2005.

TREISMAN, R.; ORKIN, S.H.; MANIATIS, T. Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned β thalassaemia genes. **Nature**. v. 302, p. 591-596, 1983.

TUZMEN, S.; SCHECHTER, A.N. Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic methods for elucidating β -thalassemia mutations. **Blood Reviews**. v.15, p.19-29, 2001.

VARAWALLA, N.Y.; OLD, J.M.; WEATHERALL, D.J. Rare β -thalassemia mutations in Asian Indians. **British Journal of Haematology**. v. 79, p. 640-644, 1991.

VARAWALLA, N.Y.; OLD, J.M.; SARKAR, R.; VENKATESAN, R.; WEATHERALL, D.J. The Spectrum of β -Thalassaemia Mutations on the Indian Subcontinent: Basis for Prenatal Diagnosis. **British Journal of Haematology**. v. 78, p. 242-247, 1991.

VARAWALLA, N.Y.; FITCHES, A.C.; OLD, J.M. Analysis of β -globin haplotypes in Asian Indians: origin and spread of β -thalassemia on the Indian subcontinent. **Human Genetics**. v. 90, p. 443-449, 1992.

VARELA, V.; ABREU, S.; ROSSETTI, L.C.; TARGOVNIK, H. Mutaciones β -talasémicas más frecuentes em la población argentina. **Sangre**. v. 41, n. 2, p. 137-140, 1996.

VAZ, F.E.E.; THAKUR, C.B.; BANERJEE, M.K.; GANGAL, S.G. Distribution of β -thalassemia mutations in the Indian population referred to a diagnostic center. **Hemoglobin**. v. 24, n. 3, p. 181-194, 2000.

VENKATESAN, R.; SARKAR, R.; OLD, J.M. β -Thalassaemia Mutations and their Linkage to β -Haplotypes in Tamil Nadu in Southern India. **Clinical Genetics**. v. 42, p. 251-256, 1992.

WAJCMAN, H.; DRUPT, F.; HENTHORN, J.S.; PRECHU, C.; RIOU, J.; PROME, D.; GALACTEROS, F. Two news variants with the same substitution at position beta122: Hb Bushey [β 122 (GH5)Phe \rightarrow Leu] and Hb Casablanca [β 65 (E9)Lys \rightarrow Met; β 122 (GH5)Phe \rightarrow Leu]. **Hemoglobin**. v. 24, n. 2, p. 125-132, 2000.

WAYE, J.S.; ENG, B.; PATTERSON, M.; WASI, P.; CHUI, D.H.K.; FRANCOMBE, W.H.; SHER, G.D.; OLIVIERI, N.F. Severity of β -Thalassemia Due to Genotypes Involving the IVS-I-6 (T→C) Mutation. **American Journal of Hematology**. v. 50, p. 15-19, 1995.

WAYE, J.S.; ENG, B.; PATTERSON, M.; CHUI, D.H.K., FERNANDES, B.J. Novel β -thalassemia mutation in patients of jewish descent: [β 30(B12) Arg→Gly or IVS-I (-2) (A→G)]. **Hemoglobin**. v. 22, n. 1, p. 83-85, 1998.

WAYE, J.S.; WALKER, L.; PATTERSON, M.; CHUI, D.H.K. Identification of two new β -thalassemia splice mutations: IVS-I (G→C) and IVS-I (-2) (G→C). **Hemoglobin**. v. 26, n. 1, p. 87-89, 2002.

WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. **The Thalassaemia Syndromes**. 3th Ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1981.

WEATHERALL, D.J. The Thalassaemias. In: WILLIAMS, W.J.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A.J.; RUNDLES, R.W. **Hematology**. 4th Ed. New York: McGraw Hill Book Company, 1990.

WEATHERALL, D.J. Phenotype-Genotype Relationships in Monogenic Disease: Lessons from the Thalassaemias. **Nature Reviews Genetics**. v. 2, p. 245-255, 2001.

ZAGO, M.A., COSTA, F.F.; FREITAS, T.C.; BOTTURA, C. Clinical, hematological and genetic features of sickle-cell anemia and sickle cell- β thalassemia in a Brazilian population. **Clinical Genetics**. v.18, p.58-64, 1980.

ZAGO, M.A.; COSTA, F.F.; TONE, L.G.; BOTTURA, C. Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population. **Human Heredity**. v. 33, n. 2, p. 125-129, 1983.

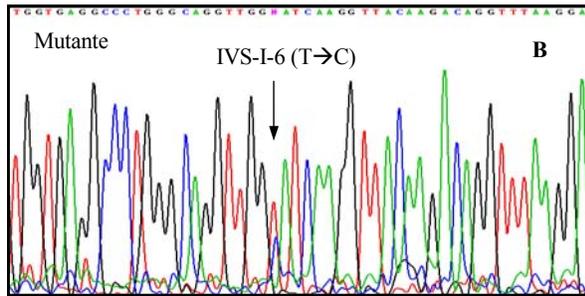
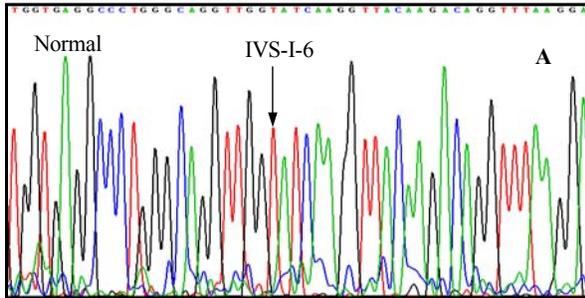
ZAGO, M.A. Talassemias. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia Fundamentos e Prática**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2004, Cap. 31, p. 309-328.

ZAHED, L.; QATANANI, M.; NABULSI, M.; TAHER, A. β -thalassemia mutations and haplotype analysis in Lebanon. **Hemoglobin**. v. 24, n. 4, p. 269-276, 2000.

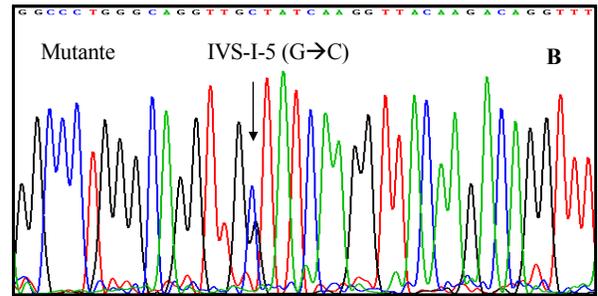
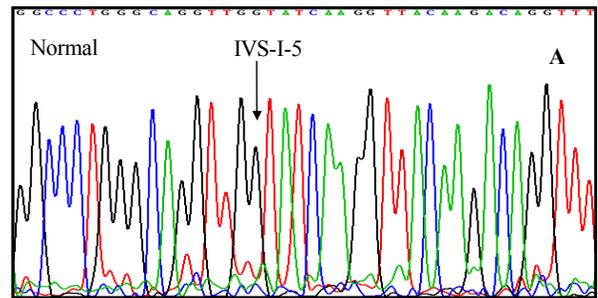
Anexos

ANEXO 1

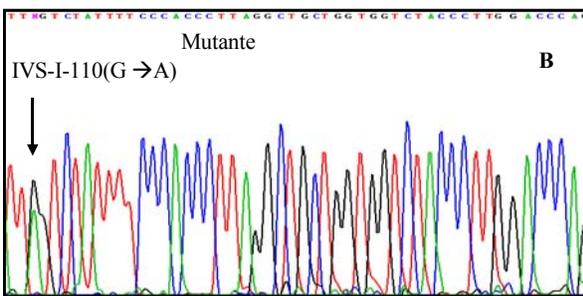
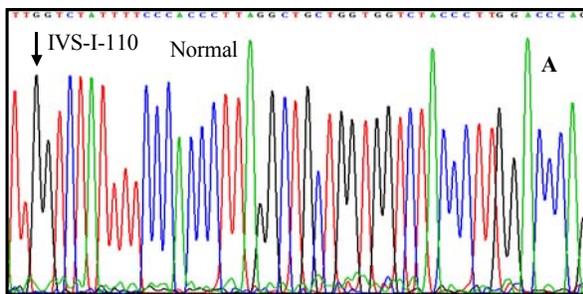
Eletroferogramas do gene da globina β humana, identificando mutações encontradas para talassemia β no estado de Pernambuco.



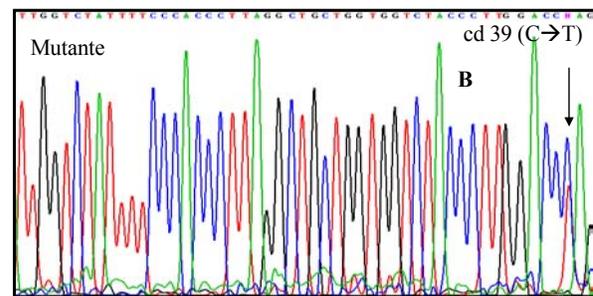
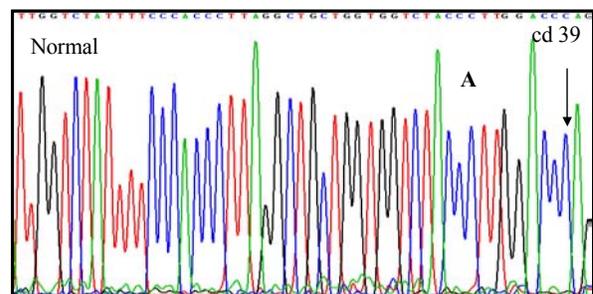
A. Fita sense normal da posição 6 no íntron 1; B. Fita sense com a mutação na posição 6 (T→C) no íntron 1.



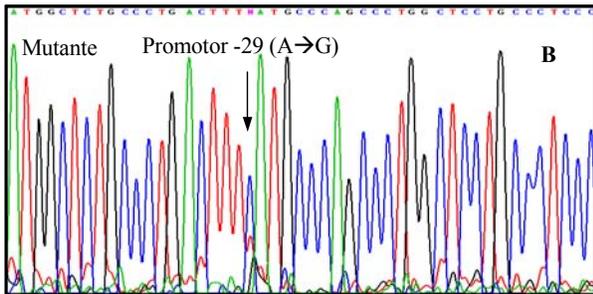
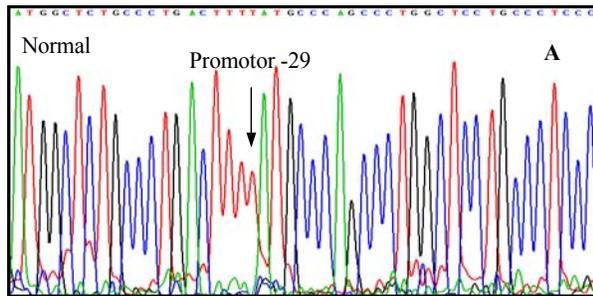
A. Fita sense normal da posição 5 no íntron 1; B. Fita sense com a mutação na posição 5 (G→C) no íntron 1.



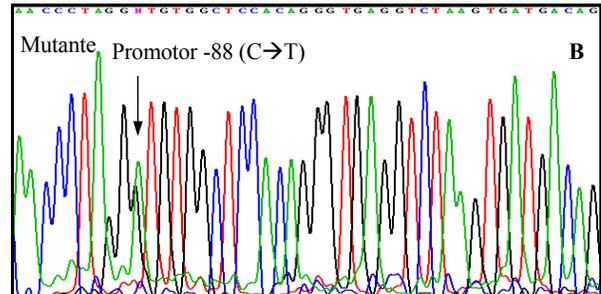
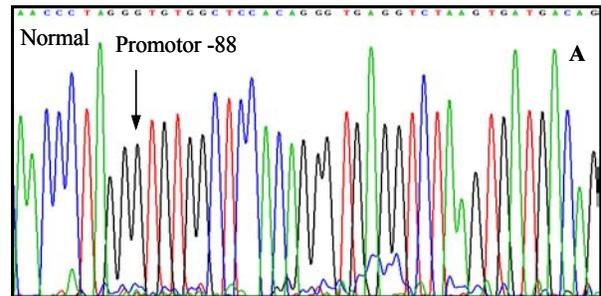
A. Fita sense normal da posição 110 no íntron 1; B. Fita sense com a mutação na posição 110 (G→A) no íntron 1.



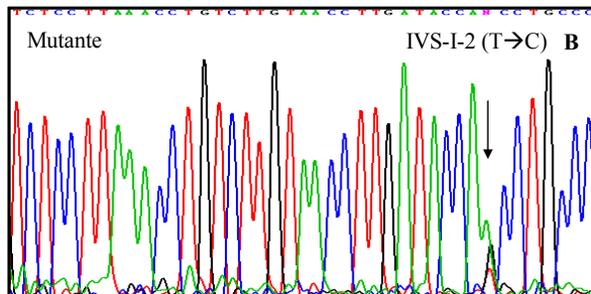
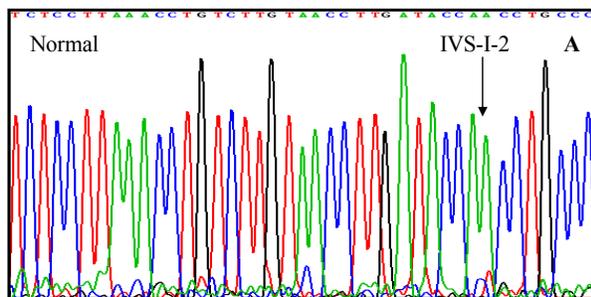
A. Fita sense normal de uma região do éxon 1; B. Fita sense com a mutação no códon 39 (CAG → TAG) no éxon 1.



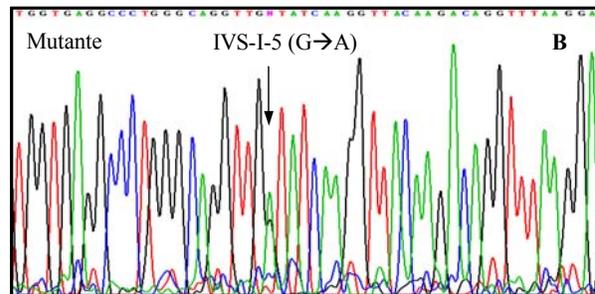
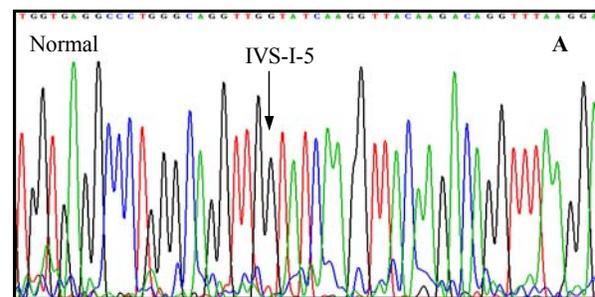
A. Fita antisense normal da posição -29 na região promotora; **B.** Fita antisense com a mutação na posição -29 (A→G).



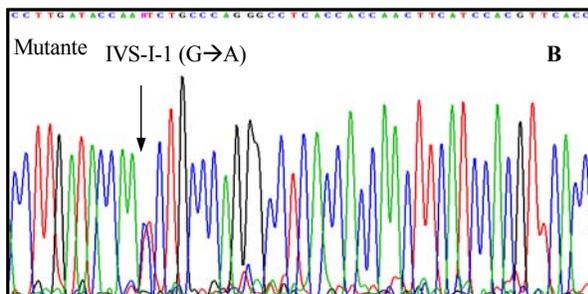
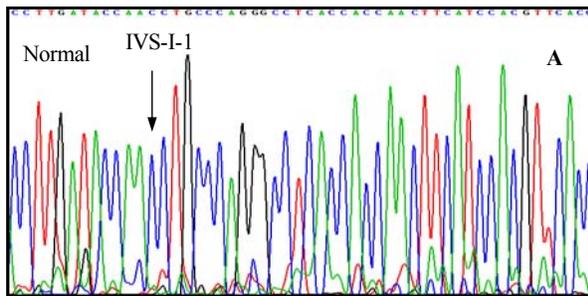
A. Fita antisense normal da posição -88 na região promotora; **B.** Fita antisense com a mutação na posição -88 (C→T).



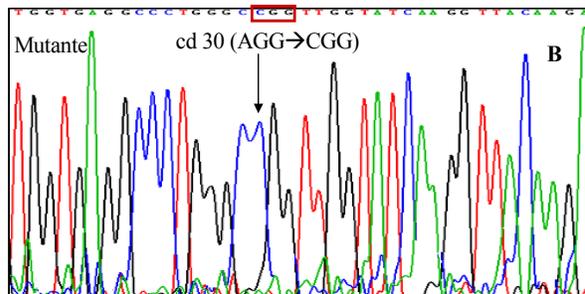
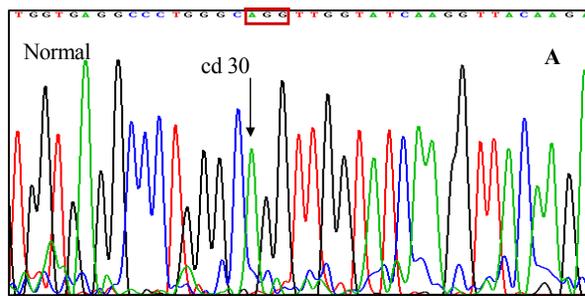
A. Fita antisense normal da posição 2 no íntron 1; **B.** Fita antisense com a mutação na posição 2 (T→C) no íntron 1.



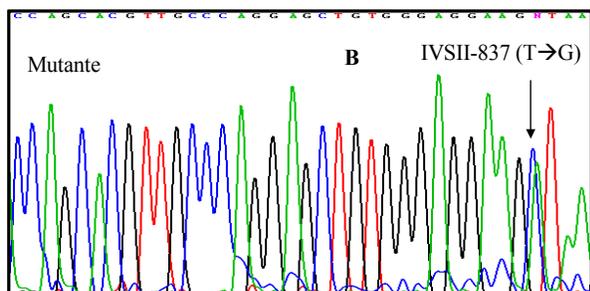
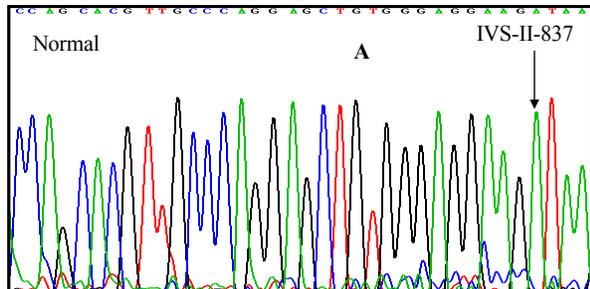
A. Fita antisense normal da posição 5 no íntron 1; **B.** Fita antisense com a mutação na posição 5 (G→A) no íntron 1.



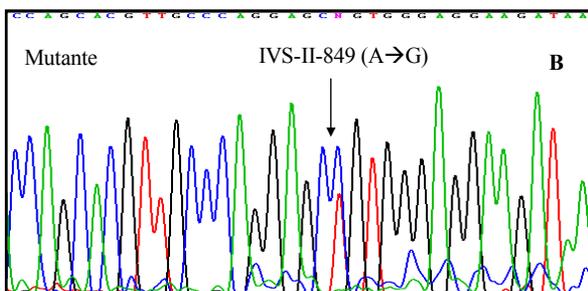
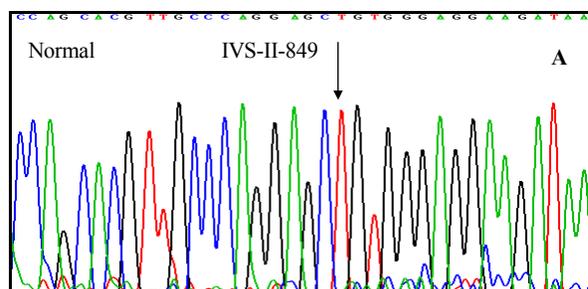
A. Fita antisense normal da posição 1 no íntron 1; **B.** Fita antisense com a mutação na posição 1 (G→A) no íntron 1.



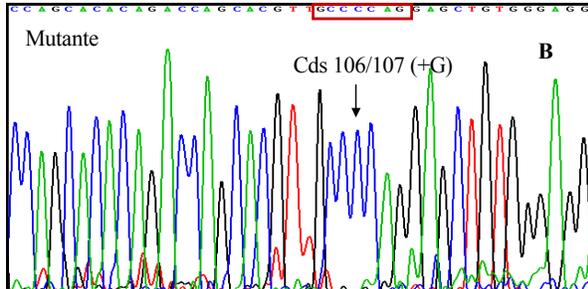
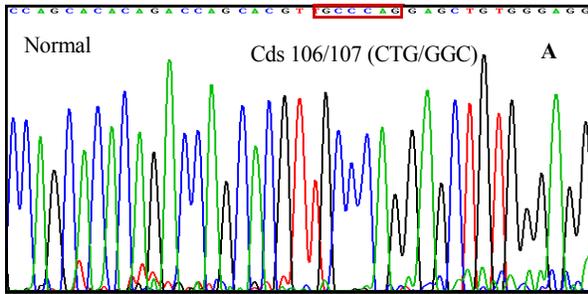
A. Fita sense normal de uma região do éxon 1 e íntron 1; **B.** Mutação no códon 30 (A→C) no éxon 1 (produto de PCR clonado em pGEM-T easy vector (PROMEGA) – fita sense).



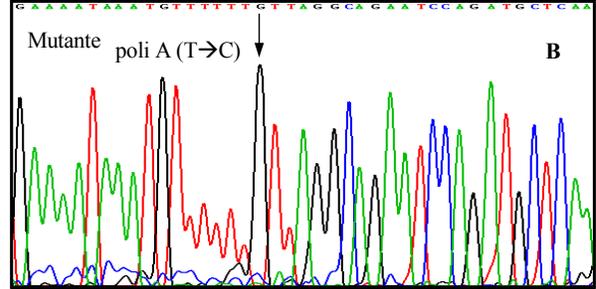
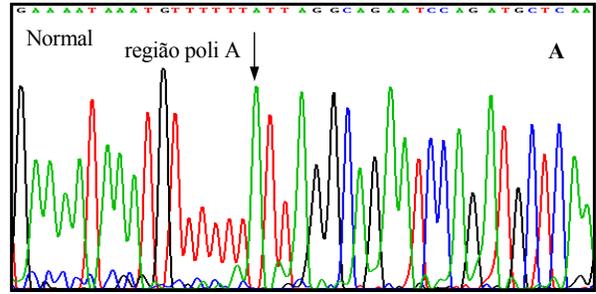
A. Fita antisense normal da posição 837 no íntron 2; **B.** Fita antisense com a mutação na posição 837 (T→G) no íntron 2.



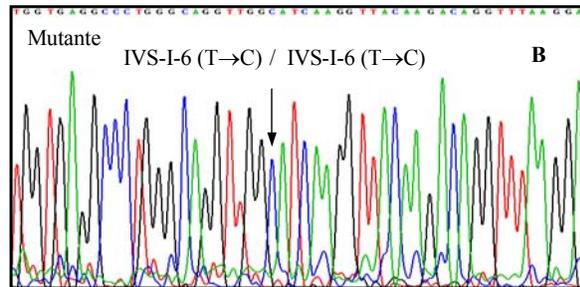
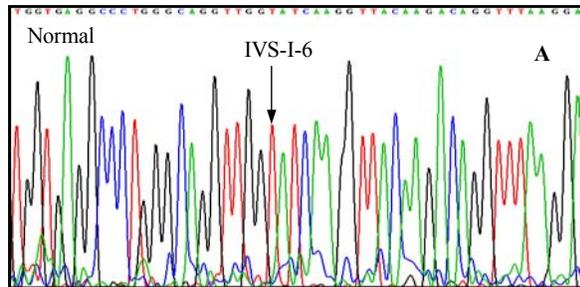
A. Fita antisense normal da posição 849 no íntron 2; **B.** Fita antisense com a mutação na posição 849 (A→G) no íntron 2.



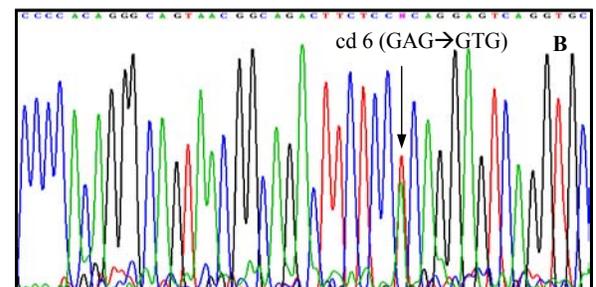
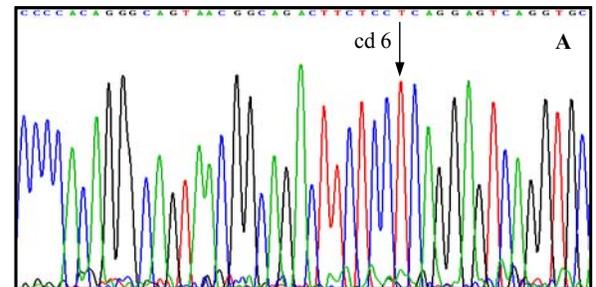
A. Fita antisense normal de uma região do íntron 2 e éxon 3; **B.** Fita antisense com a inserção de um nucleotídeo (+G) entre os códon 106 e 107 no éxon 3 (produto de PCR clonado em pGEM-T easy vector (PROMEGA) – fita antisense).



A. Fita antisense normal da região poli A; **B.** Fita antisense com a mutação de T→C na região poli A (AATAA→AACAA) (produto de PCR clonado em pGEM-T easy vector (PROMEGA) – fita sense).



A. Fita sense normal da posição 6 no íntron 1; **B.** Fita sense com a mutação na posição 6 (T→C) no íntron 1 em homocigose.

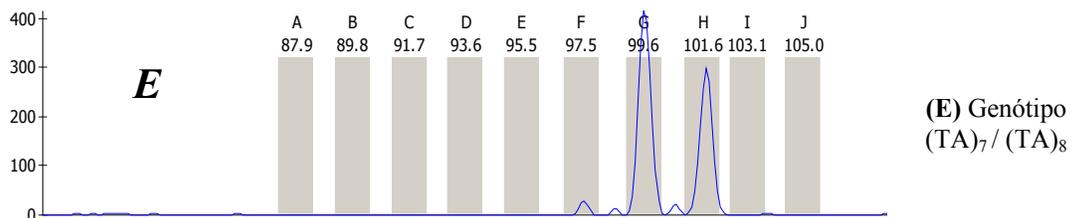
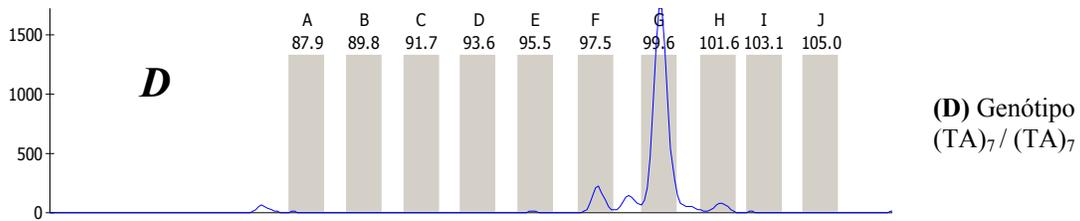
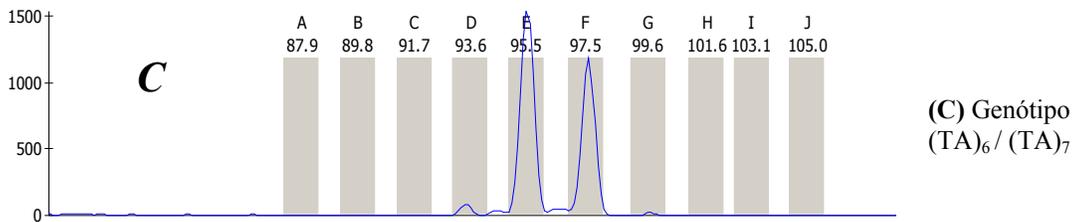
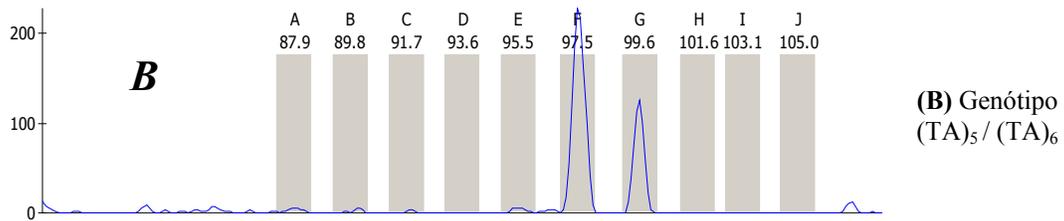
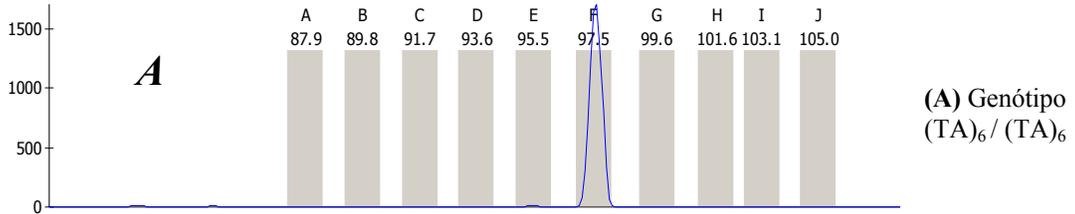


A. Fita antisense normal de uma região no éxon 1; **B.** Fita antisense com mutação A→T no códon 6, mutação da Hb S (GAG→GTG).

ANEXO 2

Identificação dos genótipos *UGT1A1* por análise de fragmentos.

Fragmentos: 96 → (TA)₅; 98 → (TA)₆; 100 → (TA)₇ e 102 → (TA)₈.



ANEXO 3

Tabela 1: Características hematológicas e moleculares dos pacientes com talassemia β maior e β intermediária (n=47).

Nº Pac	Sexo	IA	ID	Genótipo β	Haplótipo	XmnI	Fenótipo	Genótipo α	Hb	VCM	HbA ₂	HbF	Genótipo UGT1A1	BI
1	F	51	36	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,2	74,7	5,9	7,7	(TA) ₆ /(TA) ₆	2,77
2	F	23	3	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-110 (G→A)	VI / I	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,1	76,4	3,9	13,0	(TA) ₆ /(TA) ₆	3,4
3	M	29	16	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,3	74,4	6,7	18,0	(TA) ₆ /(TA) ₇	3,83
4	M	35	9	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,8	74,3	6,1	7,0	(TA) ₇ /(TA) ₇	4,55
5	M	14	6	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,1	52,3	8,7	6,2	(TA) ₆ /(TA) ₆	2,86
6	F	51	41	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / ATP	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,7	73,8	5,9	18,6	(TA) ₆ /(TA) ₆	3,75
7	M	7	1	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-5 (G→C)	ATP / I	-/-	TM	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,3	66,9	4,0	11,0	(TA) ₆ /(TA) ₆	2,0
8	M	37	24	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,7	76,0	7,3	10,0	(TA) ₆ /(TA) ₆	2,69
9	F	51	35	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	9,0	63,8	5,8	7,9	(TA) ₇ /(TA) ₇	5,85
10	M	33	8	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,8	71,0	7,8	7,4	(TA) ₆ /(TA) ₆	3,33
11	F	61	42	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,4	73,3	7,6	12,3	(TA) ₇ /(TA) ₇	2,36
12	M	12	2	Cd 12 (-C) / IVS-II-849 (A→G)	I / ATP	-/-	TM	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	6,6	76,1	2,7	20,0	(TA) ₆ /(TA) ₇	0,73
13	F	41	17	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C))	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	8,2	70,4	6,1	16,4	(TA) ₆ /(TA) ₆	1,67
14	F	23	12	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,4	69,3	6,3	7,1	(TA) ₇ /(TA) ₇	6,82
15	F	14	3	IVS-I-6 (T→C) / Cd 39 (C→T)	VI / II	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,4	68,7	5,0	57,9	(TA) ₇ /(TA) ₇	6,25
16	F	56	43	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,8	71,5	8,6	6,9	(TA) ₆ /(TA) ₆	2,36
17	F	14	1	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,8	55,3	6,3	7,0	(TA) ₆ /(TA) ₆	0,96
18	M	48	33	IVS-I-1 (G→A) / Cd 30 (A→C)	ATP / IX	+/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	6,8	78,7	3,1	72,2	(TA) ₆ /(TA) ₇	2,85
19	M	32	21	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,4	62,5	6,6	20,8	(TA) ₆ /(TA) ₆	2,64
20	M	48	44	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	8,6	67,6	7,8	7,9	(TA) ₆ /(TA) ₇	3,35
21	F	36	23	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	8,2	69,6	7,6	7,4	(TA) ₆ /(TA) ₆	2,49
22	M	7	1	- 29 (A→G) / IVS-I-5 (G→A)	IX / V	+/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	6,5	71,1	3,1	82,9	(TA) ₇ /(TA) ₇	3,73
23	M	18	1	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-5 (G→A)	VI / V	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,4	76,1	3,7	22,3	(TA) ₆ /(TA) ₆	2,74

Legenda: IA= Idade atual em anos; ID=Idade ao diagnóstico em anos; CD= Códon; ATP= Atípico; TI= Talassemia β intermediária; TM= Talassemia β maior; Hb= Hemoglobina (g/dL); VCM= Volume corpuscular médio (fL); HbA₂= Hemoglobina A₂ (%); HbF= Hemoglobina fetal (%); BI= Bilirrubina indireta (mg/dL).

Tabela 1: Características hematológicas e moleculares dos pacientes com talassemia β maior e β intermediária (n=47).

Nº Pac	Sexo	IA	ID	Genótipo β	Haplótipo	XmnI	Fenótipo	Genótipo α	Hb	VCM	HbA ₂	HbF	Genótipo UGT1A1	BI
24	F	37	35	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	8,5	64,5	8,5	2,0	(TA) ₆ /(TA) ₆	2,16
25	F	33	35	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,6	74,8	6,5	16,3	(TA) ₆ /(TA) ₆	2,3
26	M	11	1	Cd 39 (C→T) / Cd 39 (C→T)	II / II	-/-	TM	$-\alpha^{3,7kb}/\alpha\alpha$	5,2	69,2	3,2	88,0	(TA) ₆ /(TA) ₆	0,57
27	F	37	1	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-5 (G→C)	VI / I	-/-	TM	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	5,6	73,8	2,6	7,7	(TA) ₆ /(TA) ₇	3,03
28	F	14	1	IVS-I-1 (G→A) / IVS-I-1 (G→A)	V / V	-/-	TM	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	5,5	71,2	2,7	8,0	(TA) ₆ /(TA) ₆	1,41
29	M	26	1	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-5 (G→C)	VI / I	-/-	TM	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,3	74,0	2,8	10,8	(TA) ₆ /(TA) ₆	1,79
30	M	10	1	-88 (C→T) / IVS-I-5 (G→C)	ATP / I	-/-	TM	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	6,2	77,7	2,4	2,7	(TA) ₆ /(TA) ₆	0,45
31	F	6	3	IVS-I-1 (G→A) / IVS-II-849 (A→G)	V / ATP	-/-	TM	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	5,1	71,4	2,7	97,3	(TA) ₇ /(TA) ₇	4,13
32	M	83	60	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / ATP	+/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	6,9	58,6	5,6	13,8	(TA) ₆ /(TA) ₆	1,7
33	F	40	52	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	8,0	61,4	7,3	3,1	(TA) ₆ /(TA) ₇	2,19
34	F	37	23	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,8	71,1	7,8	9,2	(TA) ₆ /(TA) ₆	1,89
35	M	33	32	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,2	76,8	7,2	8,4	(TA) ₆ /(TA) ₇	1,56
36	F	44	27	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,0	50,6	7,1	10,4	(TA) ₆ /(TA) ₇	1,19
37	M	49	41	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	6,9	76,3	7,8	8,4	(TA) ₆ /(TA) ₇	3,32
38	F	39	25	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	6,8	58,0	7,1	14,1	(TA) ₇ /(TA) ₇	3,74
39	M	41	28	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	8,6	59,1	7,3	17,9	(TA) ₇ /(TA) ₇	2,4
40	F	10	3	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-5 (G→C)	ATP / I	-/-	TM	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	6,2	64,3	3,6	13,0	(TA) ₆ /(TA) ₆	3,69
41	M	55	45	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,7	52,3	8,6	5,8	(TA) ₆ /(TA) ₇	3,03
42	F	56	46	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	6,8	74,0	7,4	3,9	(TA) ₆ /(TA) ₆	1,95
43	F	14	14	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-5 (G→C)	VI / I	-/-	TI	$-\alpha^{3,7kb}/\alpha\alpha$	6,8	65,7	6,5	49,0	(TA) ₆ /(TA) ₇	1,24
44	M	24	4	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,4	64,3	7,0	14,3	(TA) ₇ /(TA) ₇	5,4
45	F	45	36	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-6 (T→C)	VI / VI	-/-	TI	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,3	68,3	7,1	20,8	(TA) ₆ /(TA) ₆	2,24
46	M	27	1	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-110 (G→A)	VI / I	-/-	TM	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	8,8	77,5	3,8	9,2	(TA) ₆ /(TA) ₇	3,09
47	F	26	1	IVS-I-6 (T→C) / IVS-I-5 (G→C)	VI / I	-/-	TM	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	6,0	74,0	3,2	16,5	(TA) ₆ /(TA) ₆	1,07

Legenda: IA= Idade atual em anos; ID=Idade ao diagnóstico em anos; Cd= Códon; ATP= Atípico; TI= Talassemia β intermediária; TM= Talassemia β maior; Hb= Hemoglobina (g/dL); VCM= Volume corpuscular médio (fL); HbA₂= Hemoglobina A₂ (%); HbF= Hemoglobina fetal (%); BI= Bilirrubina indireta (mg/dL).

Tabela 2: Características hematológicas e moleculares dos pacientes com S/ β talassemia (n=70).

Nº pac	Sexo	IA	ID	Mutação	Haplótipo β^S/β^{Tal}	<i>Xmn1</i>	Genótipo α	Hb	VCM	HbS	HbF	HbA	HbA ₂	<i>UGT1A1</i>	BI
1	M	38	34	IVS-I-6 (T→C)	Benin / VI	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	11,2	73,1	69,2	1,1	25,4	4,3	(TA) ₆ /(TA) ₇	1,89
2	M	13	2	IVS-I-1 (G→A)	CAR / V	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	6,9	76,7	82,5	11,7	0	5,8	(TA) ₆ /(TA) ₇	1,26
3	F	12	1	Cd 39 (C→T)	CAR / I	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,3	75,8	82,8	17,8	0	4,4	(TA) ₆ /(TA) ₆	3,4
4	M	14	2	Cd 39 (C→T)	CAR / I	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,7	67,4	85	10,3	0	4,7	(TA) ₆ /(TA) ₇	2,04
5	M	9	2	IVS-I-5 (G→C)	Benin / I	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,0	63,8	64,2	27,7	4,0	4,1	(TA) ₆ /(TA) ₆	1,32
6	F	24	21	poli A (T→C)	Benin / I	-/-	$-\alpha^{3,7kb}/\alpha\alpha$	11,0	73,6	71,7	2,4	21,1	4,8	(TA) ₅ /(TA) ₇	0,54
7	M	6	1	IVS-I-5 (G→A)	CAR / V	-/-	$-\alpha^{3,7kb}/\alpha\alpha$	10,1	69,1	71,4	17,2	6,2	5,2	(TA) ₆ /(TA) ₇	1,08
8	F	4	1	IVS-I-5 (G→C)	CAR / I	-/-	$-\alpha^{3,7kb}/\alpha\alpha$	7,2	54,2	73,4	13,8	8,7	4,2	(TA) ₆ /(TA) ₆	0,56
9	F	53	47	Cd 39 (C→T)	CAR / II	-/-	$-\alpha^{3,7kb}/\alpha\alpha$	8,2	75,4	84,2	9,4	0	6,4	(TA) ₆ /(TA) ₇	2,35
10	M	33	8	IVS-I-6 (T→C)	CAR / VI	-/-	$-\alpha^{3,7kb}/\alpha\alpha$	12,4	75,6	69,0	0,4	26,2	4,4	(TA) ₆ /(TA) ₇	1,41
11	F	28	25	IVS-I-1 (G→A)	CAR / V	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,0	75,2	88,4	6,2	0	5,4	(TA) ₆ /(TA) ₇	1,57
12	M	17	15	IVS-I-6 (T→C)	CAR / VI	-/-	$\alpha\alpha\alpha^{anti\ 3,7\ kb}/\alpha\alpha$	12,8	76,8	65,5	3,3	27	4,2	(TA) ₇ /(TA) ₈	7,6
13	M	3	1	IVS-I-1 (G→A)	CAR / V	-/-	$-\alpha^{3,7kb}/\alpha\alpha$	6,0	69,6	78,0	17,4	0	4,6	(TA) ₇ /(TA) ₇	1,16
14	M	40	20	Cds 106/107 (+G)	Benin / V	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,7	70,9	83,6	10,9	0	5,5	(TA) ₆ /(TA) ₇	1,94
15	M	26	4	Cd 39 (C→T)	CAR / II	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	9,6	73,0	72,5	23,8	0	3,7	(TA) ₆ /(TA) ₆	1,31
16	F	7	4	IVS-I-5 (G→C)	CAR / I	-/-	$\alpha\alpha\alpha^{anti\ 3,7\ kb}/\alpha\alpha$	6,3	74,3	70,0	23,0	3,8	3,2	(TA) ₆ /(TA) ₇	2,12
17	F	2	1	IVS-I-5 (G→C)	CAR / I	-/-	$\alpha\alpha\alpha^{anti\ 3,7\ kb}/\alpha\alpha$	7,3	68,7	63,8	30,0	3,7	3,5	(TA) ₆ /(TA) ₇	3,08
18	M	7	5	IVS-I-6 (T→C)	ATP / VI	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	10,2	73,6	65,0	2,7	27,9	4,4	(TA) ₆ /(TA) ₆	1,67
19	M	26	14	IVS-I-5 (G→C)	Benin / I	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	6,4	76,8	77,4	11,4	6,5	4,7	(TA) ₇ /(TA) ₇	14,07
20	M	19	7	IVS-I-5 (G→C)	Benin / I	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	6,8	74,6	82,0	6,3	6,4	5,3	(TA) ₇ /(TA) ₇	10,28
21	M	26	6	Cd 39 (C→T)	CAR / II	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	9,3	76,9	81,6	13,4	0	5,0	(TA) ₆ /(TA) ₇	3,91
22	F	9	3	IVS-I-5 (G→C)	CAR / I	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,0	73,8	75,5	16,4	4,4	3,7	(TA) ₆ /(TA) ₆	3,1
23	F	8	5	IVS-I-1 (G→A)	CAR / V	-/-	$-\alpha^{3,7kb}/\alpha\alpha$	8,6	73,6	84,2	10,8	0	5,0	(TA) ₆ /(TA) ₈	1,79
24	M	14	4	IVS-II-849 (A→G)	CAR / ATP	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	8,1	64,3	88,4	4,7	0	6,9	(TA) ₆ /(TA) ₆	1,36
25	F	31	5	Cd 39 (C→T)	CAR / II	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	6,0	76,3	86,3	6,3	0	7,4	(TA) ₆ /(TA) ₇	1,06

Legenda: IA= Idade atual em anos; ID=Idade ao diagnóstico em anos; Cd= Códon; ATP= Atípico; SEN= Senegal; CAM= Camarões; Hb= Hemoglobina (g/dL); VCM= Volume corpuscular médio (fL); HbS= Hemoglobina S (%); HbF= Hemoglobina fetal (%); HbA= Hemoglobina A (%); HbA₂= Hemoglobina A₂ (%);BI= Bilirrubina indireta (mg/dL).

Tabela 2: Características hematológicas e moleculares dos pacientes com S/ β talassemia (n=70).

Nº pac	Sexo	IA	ID	Mutação	Haplótipo β^S/β^{Tal}	<i>Xmn1</i>	Genótipo α	Hb	VCM	HbS	HbF	HbA	HbA ₂	<i>UGT1A1</i>	BI
26	F	15	13	IVS-I-6 (T→C)	CAM / VI	-/-	$-\alpha^{3,7kb}/\alpha\alpha$	11,3	77,2	67	0,5	28,1	4,4	(TA) ₆ /(TA) ₆	1,77
27	F	31	6	IVS-I-5 (G→C)	CAR / I	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	6,8	78,7	84,5	4,7	6,0	4,8	(TA) ₆ /(TA) ₆	0,94
28	M	21	14	IVS-I-6 (T→C)	CAR / VI	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	11,5	73,5	66,9	2,3	26,4	4,4	(TA) ₇ /(TA) ₇	1,94
29	F	39	13	Cd 39 (C→T)	CAR / II	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	6,4	75,3	88,7	4,4	0	6,9	(TA) ₆ /(TA) ₆	1,43
30	M	11	1	IVS-II-837 (T→G)	CAR / V	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,6	68,0	77,7	11,4	6,0	5,9	(TA) ₆ /(TA) ₆	0,7
31	F	27	23	IVS-I-6 (T→C)	CAR / VI	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	12,2	71,0	70,1	0,5	25,0	4,4	(TA) ₆ /(TA) ₇	0,61
32	F	13	8	IVS-I-6 (T→C)	ATP / VI	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	11,2	67,2	66,6	0,7	28,3	4,4	(TA) ₆ /(TA) ₇	0,73
33	F	37	28	IVS-I-6 (T→C)	CAR / VI	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	11,6	74,0	66,2	1,2	28,2	4,4	(TA) ₇ /(TA) ₇	2,65
34	M	25	12	IVS-I-6 (T→C)	CAR / VI	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	12,8	73,3	67,3	1,6	26,5	4,6	(TA) ₆ /(TA) ₈	1,5
35	F	32	7	Cd 39 (C→T)	CAR / II	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,4	66,2	87,5	6,1	0	6,4	(TA) ₆ /(TA) ₆	1,35
36	F	50	24	IVS-I-5 (G→A)	CAR / V	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	8,2	75,5	80,6	6,7	7,0	5,7	(TA) ₆ /(TA) ₆	0,52
37	F	19	15	IVS-I-6 (T→C)	SEN / ATP	+/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	11,7	69,0	69,1	1,9	23,3	5,7	(TA) ₆ /(TA) ₇	1,55
38	F	38	21	IVS-I-6 (T→C)	CAR / VI	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	10,1	77,5	64,6	3,4	27,6	4,4	(TA) ₆ /(TA) ₇	0,67
39	M	20	17	IVS-I-110 (G→A)	CAR / I	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	8,2	70,1	74,9	6,2	13,1	5,8	(TA) ₆ /(TA) ₇	1,98
40	F	22	8	IVS-I-6 (T→C)	CAR / VI	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	12,3	71,1	65,5	1,6	27,6	5,3	(TA) ₆ /(TA) ₇	1,38
41	M	11	5	IVS-I-6 (T→C)	CAR / VI	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	10,4	71,0	66,3	4,0	25,3	4,4	(TA) ₆ /(TA) ₆	1,4
42	M	27	19	IVS-I-6 (T→C)	CAR / VI	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	12,6	73,1	68,2	2,5	25,2	4,1	(TA) ₆ /(TA) ₇	0,85
43	F	30	27	IVS-I-6 (T→C)	CAR / VI	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	11,5	72,3	69,0	1,1	25,8	4,1	(TA) ₆ /(TA) ₆	1,65
44	F	20	13	IVS-I-6 (T→C)	CAR / VI	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	9,7	71,2	67,0	1,8	25,6	5,6	(TA) ₆ /(TA) ₆	0,67
45	F	17	1	IVS-I-1 (G→A)	CAR / V	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	8,8	69,2	82,9	9,8	0	7,3	(TA) ₇ /(TA) ₇	1,22
46	M	27	17	IVS-I-6 (T→C)	CAR / VI	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	12,6	76,8	70,7	0,6	25,1	3,6	(TA) ₆ /(TA) ₇	1,5
47	M	18	11	IVS-I-5 (G→C)	Benin / I	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,1	61,1	84,9	4,6	5,9	4,6	(TA) ₆ /(TA) ₇	2,43
48	F	2	1	-88 (C→T)	CAR / ATP	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	10,9	70,0	59,2	23,0	12,4	5,4	(TA) ₆ /(TA) ₆	0,36
49	F	35	20	IVS-I-5 (G→C)	CAR / ATP	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7,6	77,4	64,0	28,1	3,5	4,4	(TA) ₆ /(TA) ₇	2,43
50	M	2	1	IVS-I-5 (G→C)	CAR / ATP	-/-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	6,9	50,8	65,3	24,2	5,2	5,3	(TA) ₆ /(TA) ₆	0,53

Legenda: IA= Idade atual em anos; ID=Idade ao diagnóstico em anos; Cd= Códon; ATP= Atípico; SEN= Senegal; CAM= Camarões; Hb= Hemoglobina (g/dL); VCM= Volume corpuscular médio (fL); HbS= Hemoglobina S (%); HbF= Hemoglobina fetal (%); HbA= Hemoglobina A (%); HbA₂= Hemoglobina A₂ (%);BI= Bilirrubina indireta (mg/dL).