

**Carlos Roberto Escrivão Grignoli**

**ALTERAÇÕES MOLECULARES DOS GENES DE  
GLOBINAS  $\beta$  E  $\delta$  EM HEMOGLOBINOPATIAS  
ESTRUTURAIS E TALASSÊMICAS NO BRASIL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título  
de Mestre em Ciências na área de  
Farmacologia.

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**

**CAMPINAS  
1999**



|              |                                     |
|--------------|-------------------------------------|
| UNIDADE      | BC                                  |
| N.º CHAMADA: | 6877a                               |
| V.           | Ex.                                 |
| TOMBO BC/    | 39096                               |
| PROC.        | 229.199                             |
| C            | <input type="checkbox"/>            |
| D            | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO        | R\$ 11,00                           |
| DATA         | 23/10/99                            |
| N.º CPD      |                                     |

CM-00136421-7

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

G877a Grignoli, Carlos Roberto Escrivão  
 Alterações moleculares dos genes de globinas  $\beta$  e  $\delta$  em  
 hemoglobinopatias estruturais e talassêmicas no Brasil / Carlos Roberto  
 Escrivão Grignoli. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

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

1. Hemoglobina. 2. Talassemia. 3. Mutação (Biologia) I.  
 Fernando Ferreira Costa. II. Universidade Estadual de Campinas.  
 Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

### Orientador:

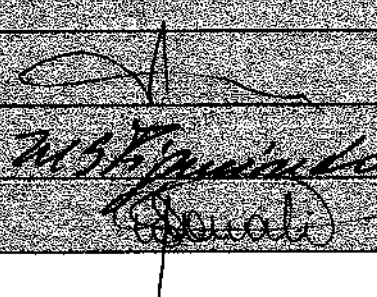
Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

### Membros:

1. Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

2. Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo

3. Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

Three handwritten signatures are present to the right of the member names. The first signature is above the name of Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa. The second signature is above the name of Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo. The third signature is above the name of Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati.

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 24/06/99

***Dedico este trabalho a meus pais Roberto e Maria Iracema, pelo carinho, incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida.***

***As minhas irmãs Lucia e Denise, pelo carinho e força.***

***A Ketí, pelo amor e carinho com os quais sempre me incentivou a prosseguir.***

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, pela confiança, apoio e orientação.

À Profa. Dra. Rosa Chelminsky Teixeira e Prof. Dr. Antonio Sérgio Ramalho, que me ensinaram o caminho das hemoglobinas.

À Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo, pelos ensinamentos iniciais de biologia molecular, apoio, incentivo e amizade.

À Profa. Dra. Maria de Fatima Sonati, pelo apoio, incentivo, por ter sido tão importante em todas as etapas da realização desse trabalho e principalmente pela amizade.

À Elzinha, Simone, Eliana, Dulcinéia e Roberta, pela amizade, incentivo e importante contribuição para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da UNICAMP, pela amizade e colaboração.

Aos amigos Eminho, Rosana, Paula, Maurício, Dilmara, Valdirene e Ucha, pela alegria, força e amizade de sempre.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização do presente trabalho.

## ÍNDICE

|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| Introdução .....                              | 1  |
| A molécula de Hemoglobina .....               | 2  |
| Os genes das globinas .....                   | 5  |
| A hemoglobina A2 ( $\alpha_2\delta_2$ ) ..... | 7  |
| As hemoglobinas Humanas Variantes .....       | 8  |
| Síndromes talassêmicas .....                  | 13 |
| Talassemia $\beta$ .....                      | 13 |
| Objetivos .....                               | 19 |
| Casuística e Métodos .....                    | 21 |
| Análise das hemoglobinas .....                | 22 |
| Análise Molecular .....                       | 24 |
| Identificação das Mutações .....              | 26 |
| Resultados .....                              | 29 |
| Discussão .....                               | 63 |
| Conclusões .....                              | 71 |
| Resumo .....                                  | 73 |
| Referências Bibliográficas .....              | 75 |

# INTRODUÇÃO

## A molécula de Hemoglobina

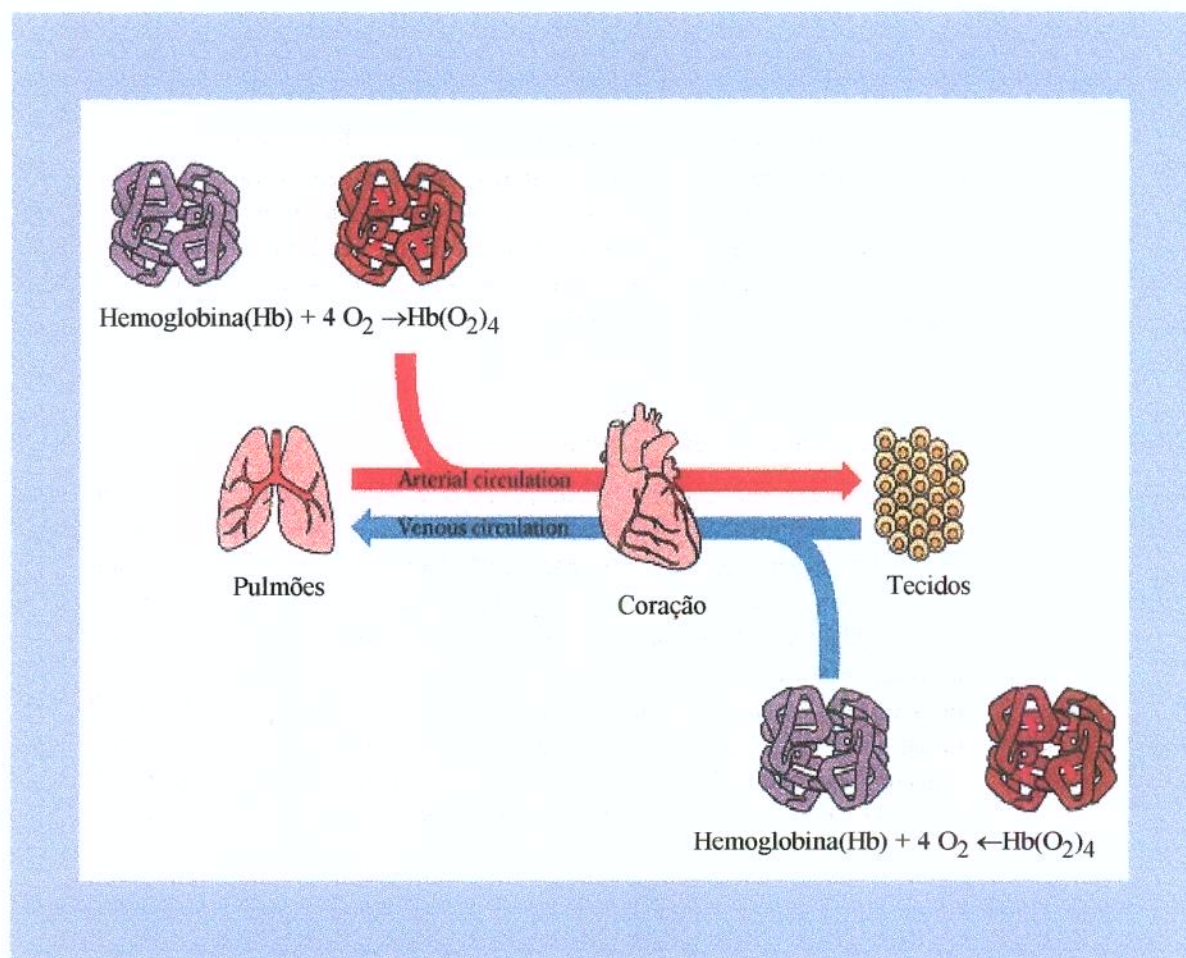
As hemoglobinas humanas compreendem um grupo de moléculas protéicas responsáveis pelo transporte de oxigênio dos capilares alveolares dos pulmões para os tecidos (fig. 1) (Bunn & Forget, 1986).

A molécula da hemoglobina apresenta-se como um tetrâmero globular com peso molecular de aproximadamente 64.500 daltons, constituída por quatro subunidades protéicas denominadas globinas, mantidas como estrutura estável através da ação de pontes de hidrogênio. Cada subunidade protéica contém um grupo heme, produto de uma complexa via enzimática que origina um composto orgânico tetracíclico (fig. 2). Juntamente com o ferro, a molécula do heme liga o oxigênio molecular, conferindo à hemoglobina a capacidade de transportar oxigênio (Dickerson & Geis, 1983).

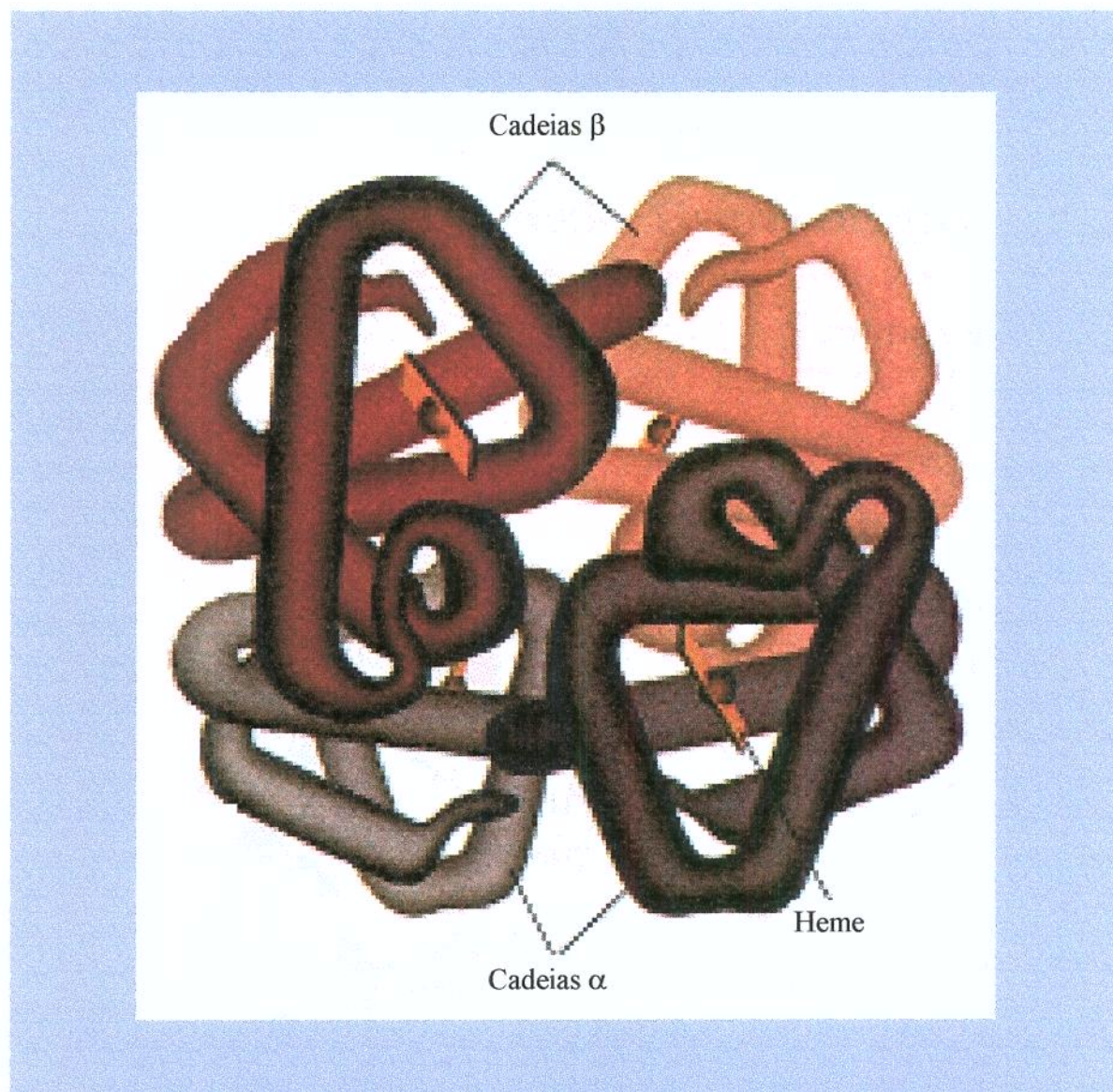
As hemoglobinas humanas normais diferem entre si pela constituição das diferentes moléculas de globina, existindo seis tipos de cadeias polipeptídicas que podem entrar na sua composição, ou seja, cadeias alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), delta ( $\delta$ ), épsilon ( $\epsilon$ ), gama ( $\gamma$ ) e zeta ( $\zeta$ ). Na maioria das hemoglobinas normais, a fração globínica é constituída por duas cadeias tipo alfa ( $\alpha$  e  $\zeta$ ) e por duas cadeias não-alfa ( $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  e  $\gamma$ ), regra essa desobedecida por apenas três hemoglobinas embrionárias. As globinas  $\gamma$  são classificadas em  $\gamma^G$  e  $\gamma^A$  de acordo com a presença de um resíduo glicil ou alanil na posição 136 da cadeia protéica (Schroeder *et al.*, 1968).

As hemoglobinas normais no adulto são a Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ) e Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ).





**Fig. 1.** Esquema do transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos pela Hemoglobina.



**Fig. 2.** Representação de uma molécula tetramérica  $\alpha_2\beta_2$  da hemoglobina normal de adulto.

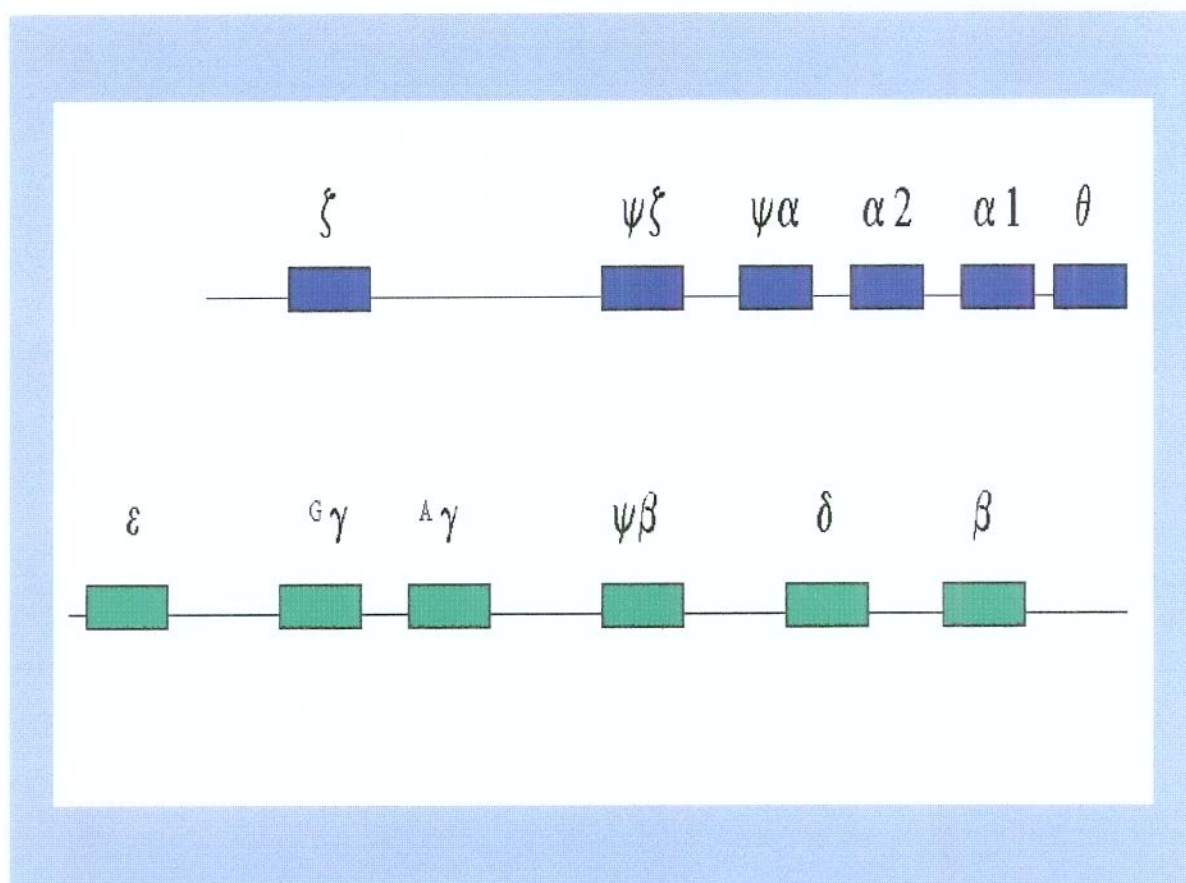
## Os genes das globinas

Os polipeptídeos que formam a hemoglobina humana são codificados por genes que estão situados em dois agrupamentos gênicos denominados alfa e beta (fig. 3). O agrupamento alfa localiza-se no braço curto do cromossomo 16 e inclui um gene de cadeia globínica embrionária ( $\zeta$ ), dois genes não funcionais, os pseudogenes  $\psi\zeta$ ,  $\psi\alpha$ , dois genes alfa ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ) e o gene  $\theta$  (Laver *et al.*, 1980). O agrupamento beta localiza-se no braço curto do cromossomo 11 e inclui um gene de cadeia embrionária  $\epsilon$ , os dois genes  $\gamma$  ( $\gamma^G$  e  $\gamma^A$ ), um pseudogene  $\psi\beta$ , o gene da globina  $\delta$  e o gene  $\beta$  (Fritsch *et al.*, 1980).

Em ambos complexos os genes são arrançados na mesma orientação transcricional, seguindo a ordem embrionário-fetal-adulto. Os genes embrionários  $\zeta$  e  $\epsilon$  localizam-se na posição 5', seguidos respectivamente pelos genes  $\alpha$  e  $\gamma$  responsáveis pela formação da chamada hemoglobina fetal, que por sua vez será substituída pelas hemoglobinas detectadas pouco antes do nascimento e durante toda a vida adulta, a partir da ativação da síntese das cadeias  $\beta$  e  $\delta$ . Este arranjo peculiar levou à suposição de que seqüências regulatórias poderiam estar presentes nas regiões intergênicas e seriam responsáveis pela programação do controle da expressão consecutiva de cada gene do grupo, durante os períodos embrionário, fetal e adulto (Maniatis *et al.*, 1980).

A região codificadora dos genes da globina humana é interrompida em duas posições por "introns" (IVS - "Intervening Sequence"), os quais separam esta região em três "exons". Nos genes do grupo beta, as seqüências são interrompidas entre os "codons" 30 e 31 e entre os "codons" 104 e 105. No grupo da globina





**Fig. 3.** Organização dos genes da globina humana.

alfa, as seqüências interrompem-se entre os "codons" 31 e 32 e entre os "codons" 99 e 100 (Tilghman *et al.*, 1978; William *et al.*, 1990).

### **A Hemoglobina A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ )**

A Hemoglobina A<sub>2</sub>, constituída por duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\delta$ , representa cerca de 2.5% do total de hemoglobina detectada em um indivíduo adulto. Sua existência foi observada inicialmente em eletroforese em géis de amido, onde apresenta mobilidade diferente daquela observada pela Hb A( $\alpha_2\beta_2$ ) (Bunn & Forget, 1986).

As cadeias de globina  $\delta$  apresentam grande homologia estrutural com as cadeias  $\beta$ , de maneira que estes peptídeos diferem em apenas 10 dos 146 resíduos de aminoácidos. Entretanto, as cadeias  $\delta$  e  $\beta$  dão origem a moléculas de hemoglobina que diferem consideravelmente em relação à carga: Hb A (pI=7.4) e Hb A<sub>2</sub> (pI=6.95) (Bunn & Forget, 1986).

Devido à similaridade estrutural das cadeias  $\beta$  e  $\delta$ , acredita-se que as hemoglobinas A e A<sub>2</sub> apresentem propriedades funcionais idênticas. Entretanto, em função da pequena quantidade de hemoglobina A<sub>2</sub> detectada nos eritrócitos, parece improvável que esta hemoglobina desempenhe qualquer papel fisiológico no transporte de oxigênio (Bunn & Forget, 1986).

Apesar do seu pequeno significado fisiológico, tem grande valia na prática médica, uma vez que os seus níveis se apresentam alterados em várias condições patológicas. Níveis elevados dessa hemoglobina são encontrados principalmente nos heterozigotos do gene da talassemia  $\beta$ . Níveis diminuídos de hemoglobina A<sub>2</sub>

são observados nas síndromes da hemoglobina Lepore, nas talassemias  $\alpha$ ,  $\delta$  e  $\delta\beta$  e anemia ferropriva.

Os baixos níveis de globina  $\delta$  detectados nas células sanguíneas, reflete várias características de estrutura e expressão do gene responsável pela produção desta cadeia. Sua sequência promotora não é efetiva e sua transcrição ocorre em uma taxa menor que a do gene  $\beta$  (Maniatis *et al.*, 1980).

### **As Hemoglobinas Humanas Variantes**

As moléculas variantes de hemoglobinas são caracterizadas pela anormalidade estrutural de uma subunidade particular da globina. Apresentam herança codominante, de acordo com a genética mendeliana clássica, e podem ou não resultar em alterações clínicas detectáveis.

No início dos anos 50, em trabalho clássico de Pauling, a anemia falciforme foi identificada como secundária a uma hemoglobina eletroforeticamente anormal. Posteriormente, foi demonstrado que a Hb S consiste na existência de uma única substituição de aminoácido na cadeia  $\beta$  ( $\beta 6$  Glu-Val). Cerca de 8% dos negros norte-americanos são portadores do gene da Hb S, e prevalência semelhante foi estimada em nosso país (Zago & Costa, 1985; Costa *et al.*, 1989).

Em seguida à identificação da Hb S, foram caracterizadas as Hbs C, D e E. Atualmente, existe um grande número de variantes conhecidas. A maioria delas foi descritas por comportamento eletroforético anormal. O método inicial na investigação de hemoglobinas anômalas inclui, em geral, a eletroforese em acetato de celulose ou gel de amido em pH alcalino (8,3 a 8,8). Entre as variantes sem manifestações clínicas, 95% apresentam substituição de um aminoácido que

acarreta mudança de carga elétrica na proteína. Por outro lado, uma parte significativa das variantes com manifestações clínicas graves, apresentam substituições que não alteram a carga elétrica protéica (Moo-Penn *et al.*, 1980). Outras técnicas complementares e de uso obrigatório incluem eletroforese em agar citrato pH 6,0 a 6,5 e solubilidade em tampão fosfato concentrado (Schneider & Barwick, 1982; Winter & Yodh, 1983). Pode-se ainda realizar eletroforese em acetato de celulose (pH 8,6) e em agar citrato (pH 6,0 a 6,5), juntamente com eletroforese de cadeias de globina em uréia 6M, ou eletroforese de alta resolução, como a focalização isoeletrica (Basset *et al.*, 1978; Galacteros *et al.*, 1980) ou ainda a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (Strahler *et al.*, 1983), as quais têm também provado serem úteis no isolamento de variantes que escapam à detecção por outros métodos. Estes métodos em conjunto são capazes de identificar, sem dúvidas, as variantes mais comuns, como Hb S e Hb C. No entanto, para que hemoglobinas anômalas menos frequentes sejam caracterizadas é essencial a digestão da cadeia de globinas e a separação dos fragmentos por HPLC ou eletroforese/cromatografia ("fingerprinting"), seguidas da análise dos aminoácidos. Mais recentemente, várias hemoglobinas anômalas foram identificadas pela análise de DNA, que evita os complexos e demorados procedimentos de análise protéica.

Em 1958, Gerald & Diamond, descreveram em indivíduos de origem italiana, uma hemoglobina de mobilidade reduzida em relação a Hb A. A análise estrutural dessa hemoglobina revelou uma cadeia híbrida que consistia da metade n-terminal de uma cadeia  $\beta$  produto de um gene híbrido  $\delta\beta$ . Esta hemoglobina foi denominada Hb Lepore derivado do nome do primeiro paciente estudado. Essa variante surgiu de um processo de permutação desigual durante a meiose, que acontece devido ao fato dos dois genes serem altamente homólogos (diferindo

somente em 10 dos seus 146 aminoácidos) e contíguos no cromossomo 11 (fig.4). Os genes mutantes resultam da fusão da extremidade 5' do gene  $\delta$  e da extremidade 3' do gene  $\beta$ , produzindo uma deficiência de 7,4 Kilobases na região  $\delta\beta$  (Flavell *et al.*, 1978).

A síntese da cadeias  $\delta\beta$  da Hb Lepore é intermediária entre aquela das cadeias  $\delta$  e  $\beta$ , e parece ser virtualmente confinada à medula óssea (Gill *et al.*, 1972). O comportamento de síntese da cadeia híbrida parece ser influenciado pela instabilidade do RNAm ou pela sua capacidade funcional, devido a características estruturais específicas das extremidades não codificadoras 5' ou 3' (Bank, 1978).

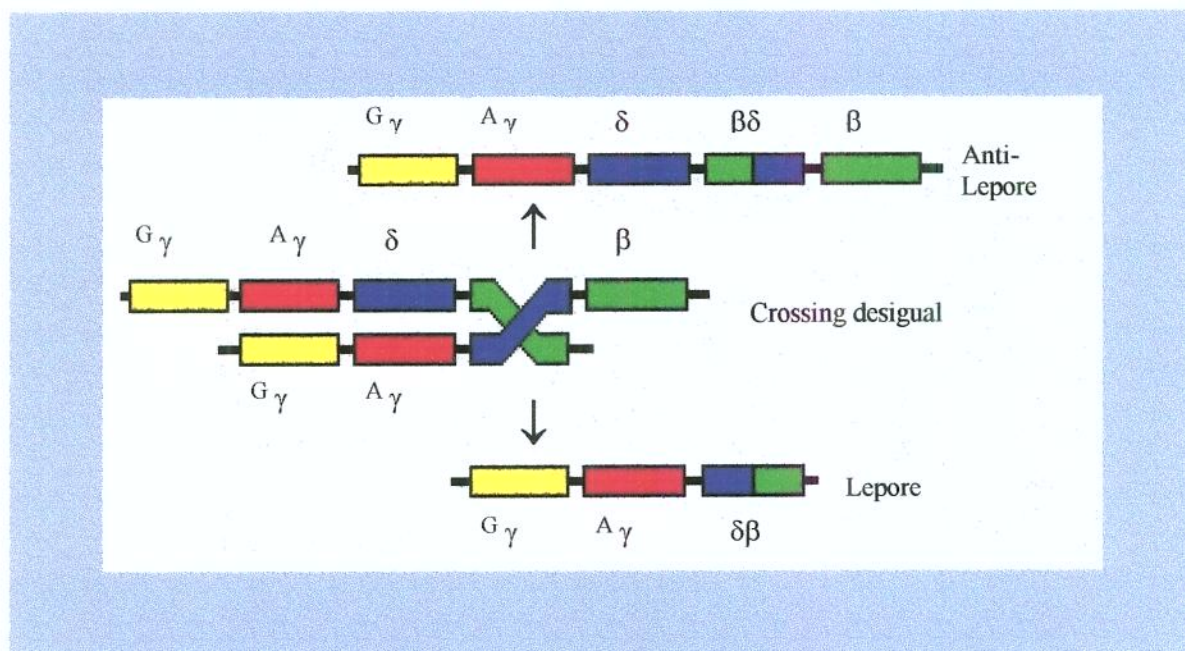
Foram descobertos 3 tipos de Hb Lepore estruturalmente distintos, que diferem no ponto onde ocorreu a quebra durante o crossing-over: Hb Lepore-Boston ( $\delta 87(\text{Gln}) \beta 116(\text{His})$ ) (Baglioni, 1962, 1965; Labie *et al.*, 1966), Hb Lepore-Baltimore ( $\delta 50(\text{Ser}) \beta 86(\text{Ala})$ ) (Ostertag & Smith, 1969) e Hb Lepore-Hollandia ( $\delta 22(\text{Ala}) \beta 50(\text{Thr})$ ) (Barnabas & Muller, 1962).

A hemoglobina Lepore Boston (sinônimos: Hb Lepore Washington, Pylos, Cyprus, The Bronx, Augusta) é de longe a mais frequentemente observada em diferentes populações do mundo (Camaschella *et al.*, 1989; Fioretti *et al.*, 1992). A hemoglobina Lepore Baltimore, mais rara, somente foi observada em uma família Afro-americana em Baltimore (Ostertag & Smith, 1969), uma família na Iugoslávia (Efremov *et al.*, 1976), uma família do norte da Sardenha (Masala *et al.*, 1990) e algumas famílias na Espanha (Marinucci *et al.*, 1979; Mavilio *et al.*, 1983; Lanclos *et al.*, 1987; Efremov *et al.*, 1988). A hemoglobina Lepore-Hollandia foi encontrada em diversas famílias da Papua, Nova Guiné (Barnabas & Muller, 1962; Curtain, 1964; McDonald *et al.*, 1975).

No Brasil, as alterações mais frequentes são as Hbs S, C e talassemia  $\beta$  (Zago & Costa, 1985). Estudos adicionais em famílias isoladas revelaram a



ocorrência de diferentes hemoglobinas variantes: Hbs Zurich, Köln, Santa Ana, D Punjab, Camperdown, Lepore-Baltimore (Zalzano & Tondo, 1982; Sonati et al, 1996), e 2 variantes descritas pela primeira vez, a Hb Porto Alegre e a Hb Niteroi (Tondo et al, 1963; Praxedes & Lehmann, 1972).



**Fig. 4.** Esquema da origem de um gene Lepore por crossing-over desigual. Os genes  $\delta$  e  $\beta$  adjacentes diferem em apenas 10 dos seus 146 aminoácidos. Caso ocorra pareamento errôneo, seguido de crossing-over intergênico, sobrevêm dois genes híbridos: um com deleção de parte de cada locus (um gene Lepore) e outro com uma duplicação correspondente (um gene anti-Lepore).

## **Síndromes talassêmicas**

As Síndromes talassêmicas compreendem um grupo heterogêneo de doenças hereditárias em que existe uma redução no ritmo de síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas da hemoglobina. Esta anormalidade, de natureza complexa, ocasiona, em última análise, a supressão total ou parcial da produção de cadeias  $\alpha$  nas talassemias  $\alpha$  e de cadeias  $\beta$  nas talassemias  $\beta$ . Esse mecanismo representa o aspecto fisiopatológico básico nas síndromes talassêmicas (Weatherall & Clegg, 1981). A cadeia que é produzida em taxa normal está em relativo excesso. Na ausência de uma cadeia complementar com a qual forma um tetrâmero, o excesso de cadeia normal é instável e forma agregados que precipitam no interior do citoplasma celular, lesam a membrana e resultam na destruição prematura do eritrócito na médula óssea (eritropoese ineficaz) ou em circulação. Em adição, o defeito da síntese da hemoglobina produz anemia hipocrômica e microcítica (Bank, 1978).

### **Talassemia $\beta$**

As síndromes talassêmicas  $\beta$  foram introduzidas no Brasil principalmente através da intensa atividade imigratória de italianos, ocorrida após a segunda metade do século XIX (Ramalho *et al.*, 1985). Na população caucasóide paulista, a frequência de heterozigotos da talassemia  $\beta$  foi estimada em 1% (Ramalho, 1976; Zago *et al.*, 1981). Já entre paulistas descendentes não miscigenados de italianos essa frequência aumenta para cerca de 6.4% (Ramalho, 1976).

As talassemias  $\beta$  são geralmente decorrentes de substituições em um único par de bases. Quando os alelos da talassemia  $\beta$  resultam em supressão total da produção de globina  $\beta$ , de forma que nenhuma Hb A está presente, a condição é designada talassemia  $\beta^0$ . Se alguma Hb A é detectável, o paciente apresenta talassemia  $\beta^+$  (Weatherall & Clegg, 1981). É importante ressaltar que em nosso meio a forma mais frequente da talassemia é a  $\beta^0$  (Zago *et al.*, 1981).

Do ponto de vista clínico, a talassemia  $\beta$  pode ser genericamente classificada em três formas: maior, intermediária e menor. Os indivíduos com talassemia maior ou anemia de Cooley apresentam anemia hemolítica grave, com repercussão acentuada sobre o crescimento e o desenvolvimento, hepatomegalia, esplenomegalia e alterações ósseas típicas. São portadores de dois alelos talassêmicos e necessitam de transfusões sanguíneas a intervalos regulares para sobreviverem.

Os heterozigotos da talassemia  $\beta$  apresentam, em geral, apenas discreta anemia que não determina manifestações clínicas relevantes e são designados como possuidores de "talassemia menor". O diagnóstico da talassemia menor pode ser feito através de eletroforese de hemoglobina, que geralmente revela um nível aumentado de Hb A<sub>2</sub>( $\alpha_2\delta_2$ ) (Ramalho *et al.*, 1985).

Entre esses limites extremos, ocorrem formas de interações gênicas associadas a quadros clínicos não tão graves quando comparados à forma homozigótica clássica, denominadas genericamente de "talassemia intermediária", na qual os indivíduos geralmente não necessitam de transfusões sanguíneas regulares (Weatherall & Clegg, 1981).

As numerosas mutações de ponto que resultam no fenótipo da talassemia  $\beta$  são classificadas de acordo com o passo metabólico atingido e a região do gene em que ocorrem (Huisman, 1992). Sendo assim, podem afetar a transcrição, o

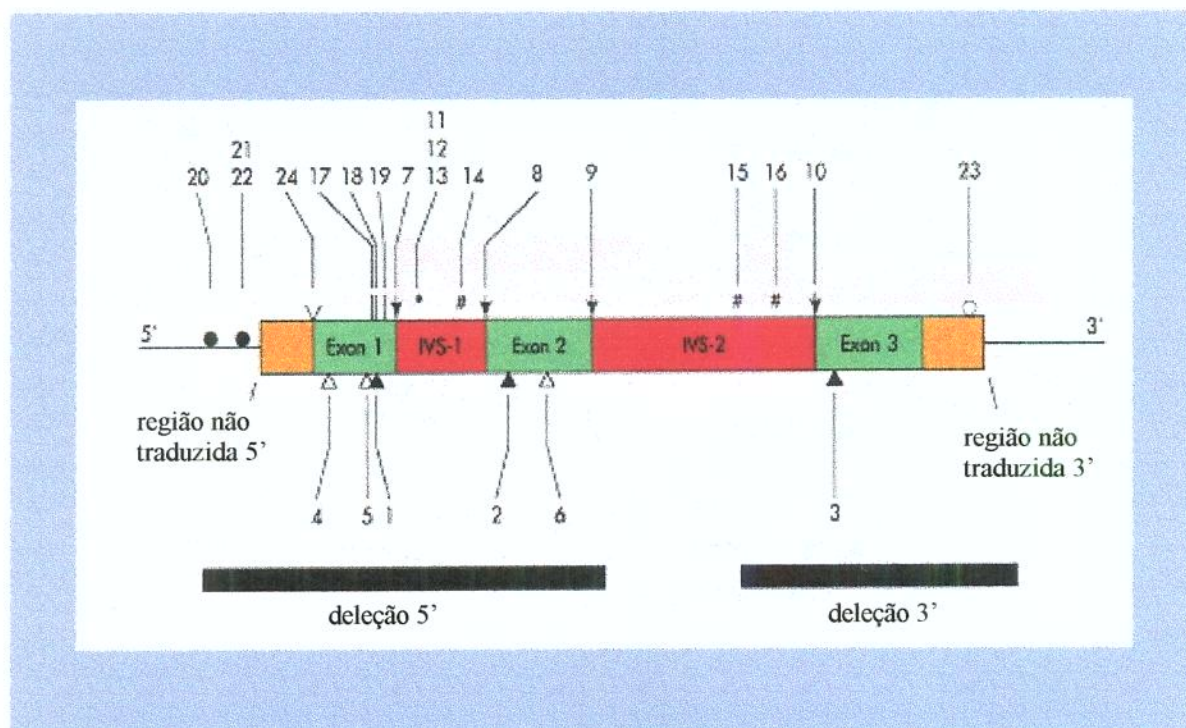
metabolismo do RNA mensageiro, o transporte do RNA do núcleo para o citoplasma, a estabilidade do RNA ou uma combinação dessas alterações (Maquat *et al.*, 1984). São descritas também, embora raras, deficiências gênicas parciais e totais (fig. 5; tab. 1) (Forget *et al.*, 1983; Orkin *et al.*, 1984).

Mutações que conduzem à terminação da síntese de cadeia globínica devido à interrupção prematura na tradução podem ser definidas pela presença de um "codon" âmbar (mutações "nonsense") ou alteração na fase de leitura (mutações "frameshift"). Estas mutações usualmente geram um produto muito instável, rapidamente degradado na célula (Huisman, 1990; Novelletto *et al.*, 1990). Um exemplo desse tipo de mutação é a substituição do nucleotídeo citosina pela timina na posição 39 do gene  $\beta$ , determinando o aparecimento de um código âmbar de terminação, com a consequente terminação precoce do RNAm na síntese protéica. Desse modo, ocorre uma supressão total da síntese da globina, caracterizando um alelo  $\beta^0$ .

Outras anormalidades decorrem de mutações nos sinais de clivagem ("splicing"). Estas seqüências são imprescindíveis para o processamento normal do RNA e assim, mutações nestas regiões podem produzir talassemia  $\beta^0$ , como no caso da mutação no "intron" 1, posição 1 (IVS1-1). Por outro lado, mutações nas posições 5 e 6 do "intron" 1 (IVS1-5 e IVS1-6) reduzem a eficiência do mecanismo normal de clivagem, mas ainda resultam na produção de quantidades detectáveis de globina  $\beta$  normal. São conhecidas cerca de 160 mutações que conduzem à talassemia  $\beta$  com manifestação clínica significativa (Liang *et al.*, 1994).

No Brasil, estudos anteriores, com o emprego de hibridização com oligonucleotídeos alelo específicos, mostraram que na população estudada a maioria das mutações é representada por aquelas originárias da região

Mediterrânea. Além disso, foi possível evidenciar que quatro mutações, a mutação âmbar no "codon" 39 (CD39), a IVS1-110, a IVS1-6 e a IVS1-1 perfazem cerca de 95% das mutações detectadas (Martins, 1993).



**Fig. 5.** Modelo do gene da globina beta mostrando os sítios de algumas mutações que causam talassemia beta. Os diferentes símbolos e números correspondem aos dados da tabela 1. Estão indicados os exons, regiões não traduzidas 5' , 3' e os introns (IVS-1 e IVS-2). A localização de duas grandes deleções também estão indicadas. (Orkin,1987).

**Tab. 1.** Exemplos de mutações que causam talassemias  $\beta$ . Os números e símbolos referem-se à figura 5.

| Tipo de mutação                    |                   | Fenótipo          | Origem           |
|------------------------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Nonsense (▲)                       |                   |                   |                  |
| 1                                  | codon 17(A→T)     | $\beta^\circ$     | Chineses         |
| 2                                  | codon 39(C→T)     | $\beta^\circ$     | Mediterrâneo     |
| 3                                  | codon 121(G→T)    | $\beta^\circ$     | Polonês          |
| Frameshift (Δ)                     |                   |                   |                  |
| 4                                  | -1 no codon 6     | $\beta^\circ$     | Mediterrâneo     |
| 5                                  | -1 no codon 16    | $\beta^\circ$     | Indiana          |
| 6                                  | +1 no codon 71,72 | $\beta^\circ$     | Chineses         |
| Splicing (↓)                       |                   |                   |                  |
| 7                                  | IVS1-1 (G→A)      | $\beta^\circ$     | Mediterrâneo     |
| 8                                  | IVS1, 3' -25 bp   | $\beta^\circ$     | Indiana          |
| 9                                  | IVS2-1 (G→A)      | $\beta^\circ$     | Mediterrâneo     |
| 10                                 | IVS2, 3' (A→G)    | $\beta^\circ$     | Negros           |
| Consensus (*)                      |                   |                   |                  |
| 11                                 | IVS1-5 (G→T)      | $\beta^+$         | Mediterrâneo     |
| 12                                 | IVS1-5 (G→C)      | $\beta^+$         | Mediterrâneo     |
| 13                                 | IVS1-6 (T→C)      | $\beta^+$         | Mediterrâneo     |
| Mudança no interior do IVS (#)     |                   |                   |                  |
| 14                                 | IVS1-110 (G→A)    | $\beta^+$         | Mediterrâneo     |
| 15                                 | IVS2-645 (C→A)    | $\beta^\circ$     | Chineses         |
| 16                                 | IVS2-745 (C→G)    | $\beta^+$         | Mediterrâneo     |
| Mudança no exon (■)                |                   |                   |                  |
| 17                                 | codon 24 (T→A)    | $\beta^+$         | Negros           |
| 18                                 | codon 26 (G→A)    | $\beta^E$         | sudeste asiático |
| 19                                 | codon 27 (G→T)    | $\beta^{Knossos}$ | Mediterrâneo     |
| Promotor (●)                       |                   |                   |                  |
| 20                                 | posição -88 (C→T) | $\beta^+$         | Negros           |
| 21                                 | posição -31 (A→G) | $\beta^+$         | Japoneses        |
| 22                                 | posição -28 (A→C) | $\beta^+$         |                  |
| Clivagem do RNA/poliadenilação (○) |                   |                   |                  |
| 23                                 | AATAAA→AACAAA     | $\beta^+$         | Negros           |
| Sítio Cap (v)                      |                   |                   |                  |
| 24                                 | posição +1 A→C    | $\beta^+$         | Ásia             |



# OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi a identificação das bases moleculares das variantes de cadeias beta e delta em 10 pacientes onde as hemoglobinas anômalas foram detectadas por eletroforese de hemoglobinas, e talassemia beta em 2 pacientes nos quais as mutações mais frequentes foram afastadas.

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram admitidos nesse estudo pacientes com hemoglobinopatias estruturais e talassêmicas provenientes dos Ambulatórios de Hematologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

### **Coleta das amostras**

As amostras de sangue venoso (5-20 ml) foram coletadas em tubos plásticos, contendo EDTA 10% (Sal di-sódio do ácido etileno-dinitrilotetracético) como anticoagulante, na concentração de 1,5 mg/ml de sangue. (Dacie & Lewis, 1984).

### **Parâmetros Hematológicos**

Os valores hematológicos e índices hematimétricos foram determinados com a utilização de contador eletrônico Cell Dyn 3500 (Abbott), imediatamente após a coleta das amostras.

## **ANÁLISE DAS HEMOGLOBINAS**

### **Preparo dos hemolisados**

Utilizou-se uma alíquota de cerca de 2 ml de sangue para o preparo do hemolisado livre de estroma. Foi desprezado o plasma e as hemácias foram

lavadas três vezes em solução salina isotônica (cloreto de sódio - 0.9%) e lisadas pela adição de 1 volume de água destilada e 0.5 volume de tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) para cada volume de células. Após vigorosa agitação e centrifugação a 3.000 rpm por 20 minutos, recolheu-se a camada superior em um tubo de ensaio e adicionou-se uma gota de cianeto de potássio ( $\text{KCN}$  - 1%) (Dacie & Lewis, 1984).

### **Determinação do padrão eletroforético**

A análise qualitativa das hemoglobinas foi realizada pela corrida eletroforética do hemolisado, em fitas de acetato de celulose em tampão Tris-EDTA-Borato, pH 8.9, por 50 minutos, a 220 Volts. As alterações hemoglobínicas verificadas em pH alcalino foram confirmadas em gel de agar 1%, tampão citrato de sódio pH 6.1, em placas de 9x12 cm, 45mA, 4°C, corado com solução de benzidina (Marengo-Rowe, 1965; Weatherall & Clegg, 1981).

### **Quantificação das hemoglobinas**

A Hb A<sub>2</sub> foi quantificada espectrofotometricamente por eluição da banda correspondente após eletroforese em acetato de celulose. Após eletroforese de 10  $\mu\text{l}$  do hemolisado em acetato de celulose, a banda correspondente a Hb A<sub>2</sub> foi recortada e a hemoglobina eluída em 3 ml de tampão, enquanto as demais hemoglobinas foram eluídas em 15 ml de tampão. Após a eluição, foram medidas as absorbâncias das duas frações a 415 nm e calculadas as porcentagens correspondentes à Hb A<sub>2</sub> (Dacie & Lewis, 1984).

A quantificação da Hb F foi determinada por desnaturação alcalina. Esta técnica consiste na adição de 0.2 ml do hemolisado a 3.2 ml de solução de NaOH 0.083 N e 6.8 ml de solução de sulfato de amônio saturada a 50%. A mistura resultante foi, então, filtrada e submetida à leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 415 nm (Betke *et al.*, 1959).

### **Eletroforese de cadeias de globina**

A separação das cadeias das globinas foi realizada pela eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12%. Adicionou-se pequeno volume do hemolisado a um volume igual de tampão contendo uréia 8 M , ácido acético glacial, 2-mercaptoetanol e pironina Y. Após a corrida, o gel foi corado com Comassie Brillante blue 0.5% em mistura de ácido acético, metanol e água (7:30:63) e descorado em mistura de ácido acético, metanol e água (7:30:63) (Dacie & Lewis, 1984).

## **ANÁLISE MOLECULAR**

### **Extração do DNA genômico**

O DNA foi isolado dos leucócitos a partir de 10-20 ml de sangue venoso (Ponez *et al.*, 1982; Sonati, 1990). O sangue foi inicialmente centrifugado a 2.500 rpm por 15 minutos. Ao conglomerado de hemácias foi adicionado solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,144 M na proporção de 5 vezes o volume de células e solução de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,01M na proporção de 0,5 vezes o volume de células. A solução foi incubada à temperatura ambiente por 20 minutos e centrifugada por 15 minutos a 2.500 rpm, a 4°C. As soluções de cloreto e bicarbonato de amônio proporcionam

a lise das hemácias. Esta etapa foi repetida até a obtenção de um precipitado nuclear de leucócitos livre de hemácias.

Os leucócitos foram dissolvidos em 10 ml de tampão contendo NaCl 0,3M, EDTA 10mM, Tris-HCl pH 7,5 10 mM, Uréia 7M, SDS 0,5% (duodecil sulfato de sódio) e incubados a 37°C por aproximadamente 12hs ou até completa lise dos leucócitos.

Após incubação foram realizadas três extrações com igual volume de mistura contendo fenol (bidestilado e saturado em Tris-HCl pH 8,0 200mM contendo 0,1% de hidroxiquinolina), clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1. Cada extração foi seguida por centrifugação a 5.000 rpm durante 15 minutos. A camada superior contendo o DNA foi cuidadosamente transferida para um novo tubo sem remover a camada de proteínas formada entre o DNA e o fenol. Uma última extração foi realizada utilizando-se igual volume de mistura clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 24:1. A solução obtida foi então precipitada pela adição de etanol absoluto gelado (2,5 vezes o volume) e de acetato de sódio 3M (10% do volume).

O DNA precipitado foi lavado em etanol a 70%, para eliminar resíduos de fenol e sal. Após descarte do álcool, o DNA foi diluído em água deionizada estéril em volume proporcional ao tamanho do precipitado obtido. A concentração do DNA foi determinada em espectrofotometro pela leitura das densidades óticas nos comprimentos de onda 260 e 280 nm em luz ultravioleta.

### **Amplificação gênica pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

As amostras de DNA genômico estudadas foram amplificadas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Erich, 1989; Mullis & Falona, 1987; Saki *et al.*,

1988), com algumas modificações. Os “primers” utilizados para a amplificação são apresentados nas tabelas 2 e 3.

Resumidamente, 1µg de DNA foi amplificado em 100µl ou 50µl da mistura de reação, contendo 10mM de Tris-HCl pH 8,3, 50mM de cloreto de potássio (KCl), 3mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 100pM de cada iniciador (“primer”), 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e 2,5U de Taq polimerase. Ao volume final foi adicionado 1 gota de óleo mineral e as reações foram processadas em aparelho ciclador de temperatura, seguindo as fases: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e 35 ciclos adicionais de 94°C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores de 55°C à 59°C, de acordo com os “primers” utilizados, por 1 minuto e extensão da reação por 1 minuto a 72°C. A última extensão prolonga-se por 7 minutos. Os produtos da reação foram separados em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultra-violeta.

## **IDENTIFICAÇÃO DAS MUTAÇÕES**

### **Sequenciamento**

O sequenciamento foi feito utilizando Circum Vent™ Thermal Cycle Dideoxy DNA Sequencing Kit (New England).

Aproximadamente 20µl do produto de amplificação por PCR, foi purificado, recebendo 20µl de acetato de amônio 4M e 160µl de isopropanol. A mistura foi mantida por 10 minutos à temperatura ambiente e a seguir foi



centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi então lavado com etanol 70% e ressuspenso em 20µl de água destilada.

Reação: 0.1 pmol de “double-stranded” DNA purificados, foram adicionados a 10mM KCl, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20mM Tris-HCL pH 8,8, 5mM MgSO<sub>4</sub>; 1,2 pmol de primer(\*), 0,2% Triton X-100 e água destilada para reação de 12µl. Adicionou-se então 2pmol de [α-<sup>35</sup>S] dATP ou [α-<sup>32</sup>P] dATP (500-1200 Ci/mmol) e 2U de VentRTM(exo-) DNA polimerase. Aliquotas de 3,2µl desta mistura foram adicionados a 4 tubos diferentes: o primeiro contendo 900µM de ddATP, 30µM de dATP e 100µM de cada dCTP, dGTP e dTTP, o segundo 480 µM ddCTP, 30µM dATP, 37µM dCTP e 100µM de cada dGTP e dTTP, o terceiro 400µM ddGTP, 30µM dATP, 37µM dGTP e 100µM de cada dCTP e dTTP, o quarto 720µM ddTTP, 30µM dATP, 33µM dTTP e 100µM de cada dCTP e dGTP. A seguir, essas misturas foram submetidas a aparelho ciclador de temperatura (Perkin-Elmer-Cetus) a 20 ciclos de 20 segundos(s) a 95°C, 20s a 55°C e 20s a 72°C. As reações foram interrompidas com 4 µl de solução contendo formamida 95%, 0,37% EDTA pH 7,0, 0,3% de azul de bromofenol e 0,3% de xileno cianol, e então submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, tampão (Tris-borato, pH 8,3 90mM, EDTA 4mM) e uréia 7M, em placas 40x34cm e 0,4mm de espessura (aparato GIBCO-BRL), por 4 horas a 1500 volts. O tampão utilizado na eletroforese foi o mesmo usado na preparação do gel. A autorradiografia foi obtida após exposição do gel seco ao filme de raio X por 16 horas.

Todas mutações encontradas foram confirmadas por sequenciamentos repetidos em diferentes produtos de PCR.

(\*) os primers utilizados são apresentados nas tabelas 2 e 3.

**Tabela 2. Sequências dos "primers" utilizados para o gene  $\beta$** 

| "primers" | Sequência 5'-3'                | Sentido     | Posição em relação ao Cap |
|-----------|--------------------------------|-------------|---------------------------|
| P1        | TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG           | "sense"     | - 135                     |
| 108       | GCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATC      | "sense"     | - 140                     |
| $\beta$ 1 | TTTGCTTCTGACACAACTGT           | "sense"     | + 2                       |
| 16        | GCAGGTTGGTATCAAGGTT            | "sense"     | + 131                     |
| 109       | CCCTTCTTCCTATGACATGAACTTAACCAT | "antisense" | + 521                     |
| P5        | TCATTCGTCTGTTTCCCATTC          | "antisense" | + 565                     |
| 229       | ATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACC    | "sense"     | + 1029                    |
| 58        | AATCCAGCTACCATTCTGC            | "sense"     | + 1214                    |
| $\beta$ 2 | TCCAGATGCTCAAGGCCCTTC          | "antisense" | + 1556                    |
| P7        | GACCTCCCACATTCCCTTTT           | "antisense" | + 1645                    |
| 230       | GTATTTTCCCAAGGTTTGAAGTAGCTC    | "antisense" | + 1693                    |

**Tabela 3. Sequências dos "primers" utilizados para o gene  $\delta$** 

| "primers" | Sequência 5' - 3'           | Sentido     | Posição em relação ao Cap |
|-----------|-----------------------------|-------------|---------------------------|
| 306       | TTGATTTTTCATTCTCACA         | "sense"     | - 114                     |
| 303       | GGACCAGCATAAAAGGCAG         | "sense"     | - 39                      |
| P3        | AGACAGAGAAGACTCTTG          | "sense"     | + 198                     |
| 137       | AGGTAGGTAAAAGAACCAAAATGTAAG | "antisense" | + 559                     |
| D1        | GTTGGCTCAGTTTCTCAGAAGC      | "sense"     | + 1301                    |
| D2        | CAGGAACCTTCTTACACACC        | "antisense" | + 1689                    |

# RESULTADOS

### Pacientes 1, 2 e 3 - Alterações da globina $\delta$

O paciente 1 é assintomático; paciente 2, branco, sexo masculino, 2 anos de idade e assintomático; paciente 3, assintomática, negra, sexo feminino, 20 anos de idade, heterozigota da Hb S. Os dados laboratoriais dos pacientes encontram-se na tabela 4.

Tabela 4. Valores hematológicos dos portadores de Hb variante.

| Paciente | GV<br>( $\times 10^{12}/l$ ) | Hb<br>(g/dl) | Ht<br>(%) | VCM<br>(fl) | HCM<br>(pg) | Hb F<br>(%) | Hb A <sub>2</sub><br>(%) | Hb A <sub>2</sub> '<br>(%) | Solubili-<br>dade (%) |
|----------|------------------------------|--------------|-----------|-------------|-------------|-------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------|
| 1        | 5,44                         | 16,7         | 46,6      | 85          | 30,3        | -           | -                        | -                          | -                     |
| 2        | 4,69                         | 8,8          | 35,3      | 75,3        | 18,7        | 0,3         | 0,8                      | 0,75                       | -                     |
| 3        | 4,93                         | 13,9         | 42        | 85          | 28          | 0,2         | 1,0                      | 0,9                        | 37,6                  |

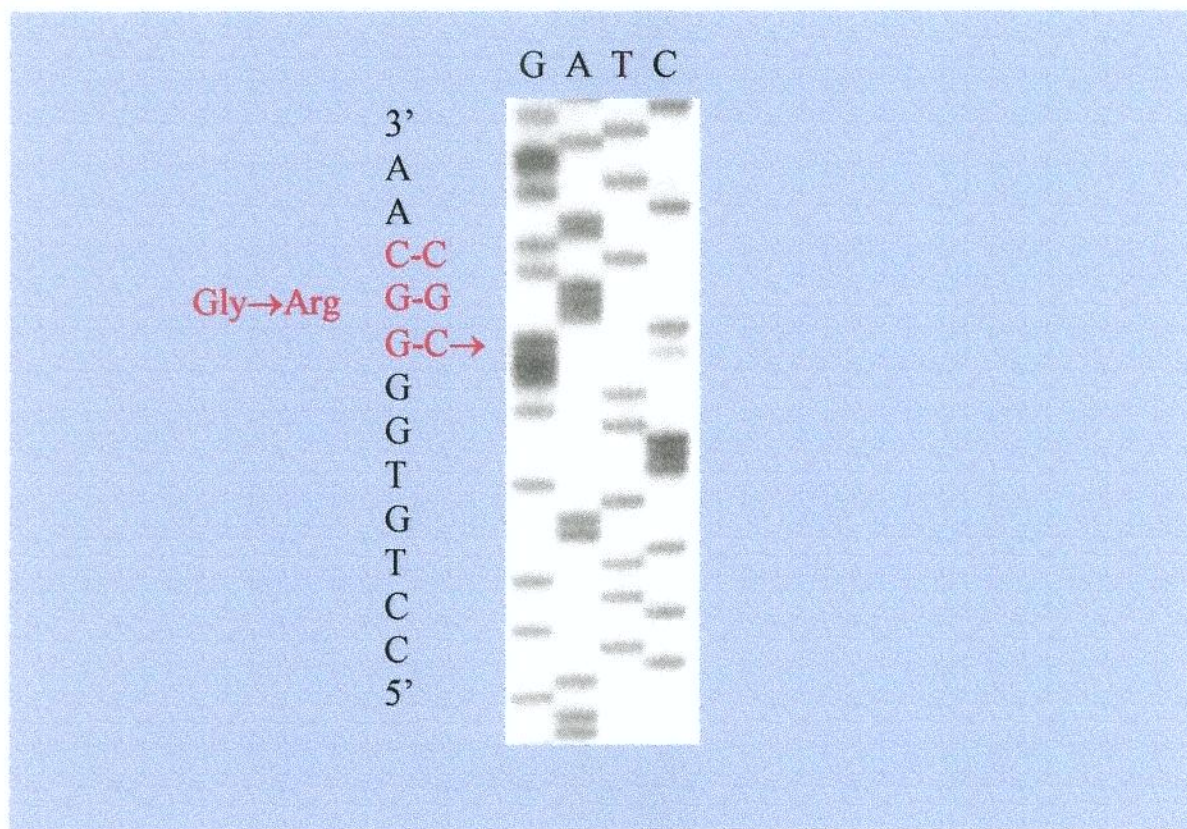
A eletroforese de hemoglobina mostrou nos pacientes 1, 2 e 3 um padrão de variante de hemoglobina A<sub>2</sub> (A<sub>2</sub>') e no paciente 3 também um padrão AS.

Com o objetivo de identificar esta variante, o gene  $\delta$  foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) empregando os "primers" 306 e 137 (tab. 3), gerando um fragmento de 678 pb correspondente aos "exons" 1 e 2, e os "primers" D1 e D2 (tab. 3), amplificando um fragmento de 399 pb correspondente ao "exon" 3.

A reação de sequenciamento foi conduzida com os "primers" 303 e P3 (tab. 3) para o fragmento de 678 pb e o "primer" D1 para o fragmento de 399 pb.

O sequenciamento com o “primer” 303 dos três pacientes demonstraram na primeira posição do “codon” 16 do gene da globina  $\delta$  a existência de duas bandas situadas na mesma altura (G e C), indicando a existência de dois nucleotídeos nessa região. Esse achado indica que concomitantemente ao “codon” GGC (codificando o aminoácido glicina) temos o “codon” CGC (codificando o aminoácido arginina), tratando-se portanto da variante de hemoglobina  $A_2$  denominada de  $A_2'$ (B2) (fig. 6).

Com isto os pacientes 1 e 2 são portadores da Hb  $A_2'$ B2 e o paciente 3 é portador da associação das Hemoglobinas S e  $A_2'$ B2. Essa  $A_2'$  é a mais comum das variantes de cadeia  $\delta$  descritas e encontrada em famílias negras (Pearson et al, 1965; Ball et al, 1966).



**Fig. 6.** Sequenciamento do fragmento de DNA de portadores de Hb A<sub>2</sub> variante - Hb A<sub>2</sub>'(B2), amplificado com os "primers" 306 e 137 e sequenciado com o "primer" 303. A substituição de GGC - CGC no "codon" 16 do gene da globina  $\delta$ , que resulta na alteração do aminoácido glicina para arginina, encontra-se representada.

#### Paciente 4

Paciente de 19 anos de idade, branca, do sexo feminino e descendência árabe-holandesa. As porcentagens encontradas de Hb A<sub>2</sub> e Hb F foram, respectivamente, 3,2% e 81,5%; seu diagnóstico clínico foi determinado como sendo uma talassemia intermediária, e o emprego de hibridização ASO demonstrou que a paciente é heterozigota da mutação  $\beta^+$  IVS1-110.

Com o objetivo de verificar a outra alteração no gene  $\beta$  desta paciente, o DNA foi amplificado pela PCR com 2 pares de “primers”. O primeiro par de “primers” gerou um fragmento de 771 pb, que incluía os “exons” 1 e 2 (“primers” P1 e P5 - Tab 2). O segundo par gerou um fragmento de 630 pb que incluía o “exon”3 (“primers” 229 e 230 - tab. 2).

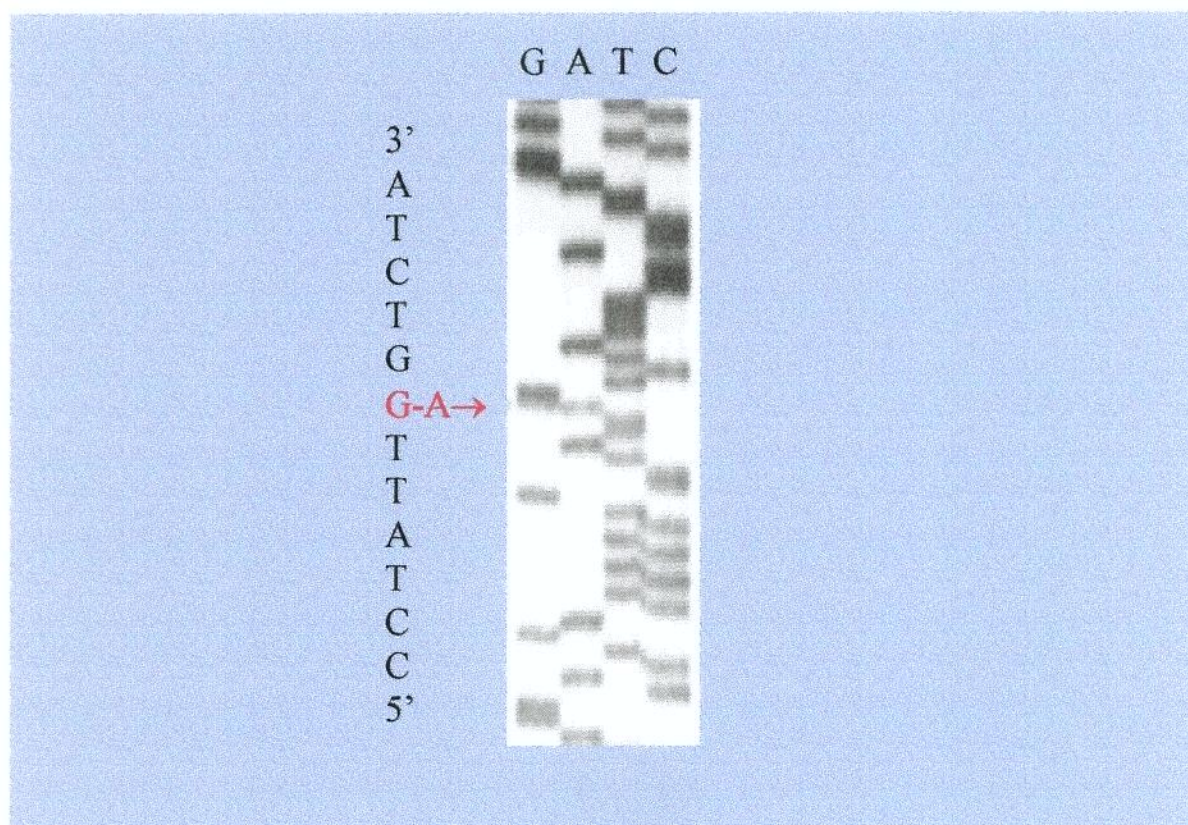
A reação de sequenciamento foi conduzida com os “primers” P1,  $\beta$ 1 e 109 para o fragmento de 771 pb e os “primers” 58 e  $\beta$ 2 para o fragmento de 630 pb.

Na figura 7 notamos que, como esperado, existem duas bandas situadas na posição 110 do IVS-1 (G-A), confirmando esta mutação em heterozigose.

O sequenciamento do fragmento de 771pb, com o “primer” P1 (fig. 8), mostra 2 bandas na região promotora do gene da globina beta posição -88 (C-T), indicando uma substituição em heterozigose que afeta a transcrição do gene da globina beta.

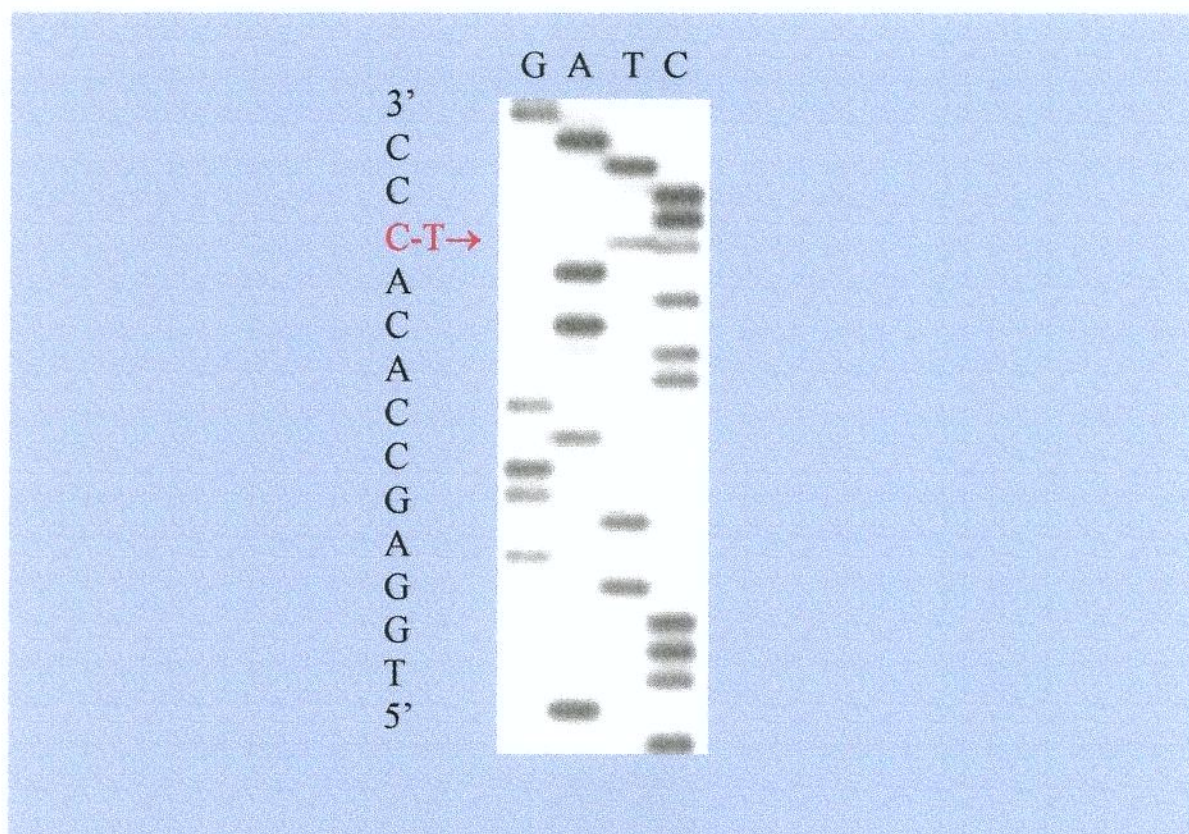
Portanto a paciente é portadora das mutações  $\beta^+$ IVS1-110 e  $\beta^+$ -88, responsáveis pelo quadro de talassemia intermediária. A mutação  $\beta^+$ -88(C→T) é a segunda causa mais comum de talassemia  $\beta$  entre as populações negras (Orkin et al, 1984; Gonzalez-Redondo et al, 1988).





**Fig. 7.** Sequenciamento do fragmento de DNA da paciente 4, amplificado com os primers P1 e P5 e sequenciado com o primer  $\beta 1$ . Representada a substituição de G-A na posição 110 do intron 1 do gene da globina  $\beta$ , que cria uma seqüência alternativa de clivagem, responsável pela talassemia  $\beta^+$ .





**Fig. 8.** Sequenciamento do fragmento de DNA da paciente 4, amplificado com os primers P1 e P5 e sequenciado com o primer P1. A substituição de C-T na região promotora -88 do gene da globina  $\beta$  está indicada pela seta.

### Paciente 5

Paciente de 11 anos, sexo feminino, com moderada anemia, hipocrômica e microcítica e com células em alvo, em acompanhamento no Ambulatório de Hematologia do Hemocentro da UNICAMP.

A eletroforese de hemoglobina da paciente, em pH alcalino, apresentou uma banda na altura da Hb A<sub>2</sub>, e em gel ágar, pH ácido, apresentou uma única banda identificada como Hb C. O estudo familiar revelou que a mãe era heterozigota da Hb C e o pai foi identificado como heterozigoto da talassemia  $\beta$ , com Hb A<sub>2</sub> de 5.6%. Assim, a paciente recebeu o diagnóstico de C/ $\beta^0$  talassemia.

Os dados hematológicos da paciente e família encontram-se na tabela 5.

**Tabela 5.** Valores hematológicos da paciente e família

|            | GV                   | Hb   | Ht   | VCM  | HCM  | Hb A <sub>2</sub> | Hb F |
|------------|----------------------|------|------|------|------|-------------------|------|
|            | x10 <sup>12</sup> /l | g/dl | %    | fl   | pg   | %                 | %    |
| Paciente 5 | 4.36                 | 8.5  | 30   | 68.8 | 19.5 | -                 | 2.4  |
| Pai        | 6.31                 | 11.9 | 40.5 | 64.2 | 18.8 | 5.6               | 1.3  |
| Mãe        | 4.18                 | 12.5 | 39   | 93.4 | 30   | -                 | -    |

Para a identificação das alterações moleculares, o gene da globina  $\beta$  foi amplificado empregando-se os “primers” P1 e P5 (Tab. 2), gerando o fragmento de

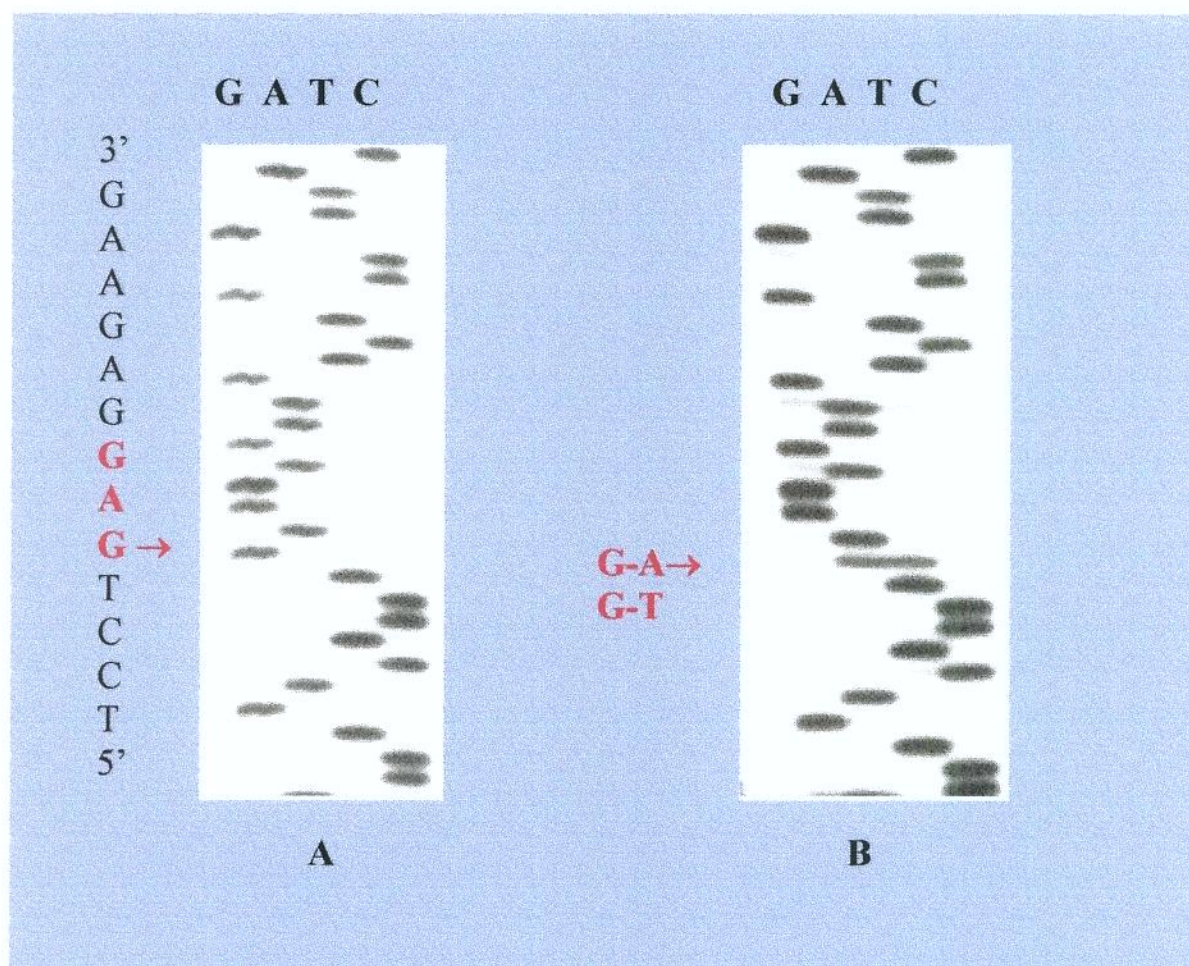
771 pb correspondente aos “exons” 1 e 2. Após, este fragmento foi sequenciado com o “primer”  $\beta 1$  (Tab 2).

A análise molecular permitiu o reconhecimento da mutação  $\beta^C$  (GAG→AAG; Glu→Lys) em heterozigose, na paciente e em sua mãe (Fig. 9 e 10).

Além disso, na paciente e em seu pai foi identificada, no codon 6, uma transversão G→T que resulta na criação de um “stop codon” no lugar do ácido glutâmico (Glu→“stop codon”)(GAG→TAG) (Fig. 9 e 11).

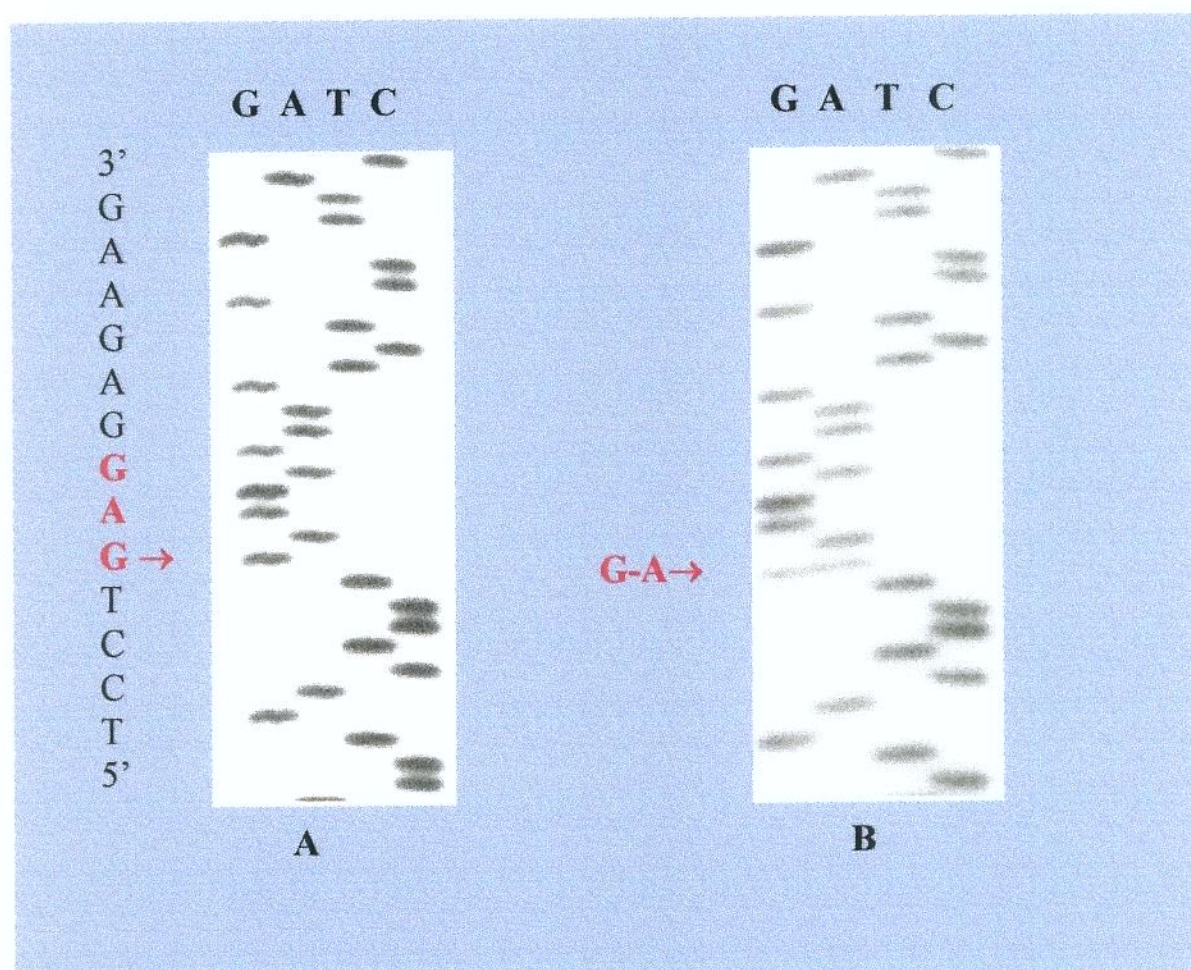
Esses achados revelaram que, nesta paciente, a talassemia  $\beta$  é resultante da mutação  $\beta^{o6}$  Glu→“stop codon”, não descrita, e a microcitose provavelmente devido a associação das 2 alterações, a Hb C e a talassemia  $\beta^o$ .



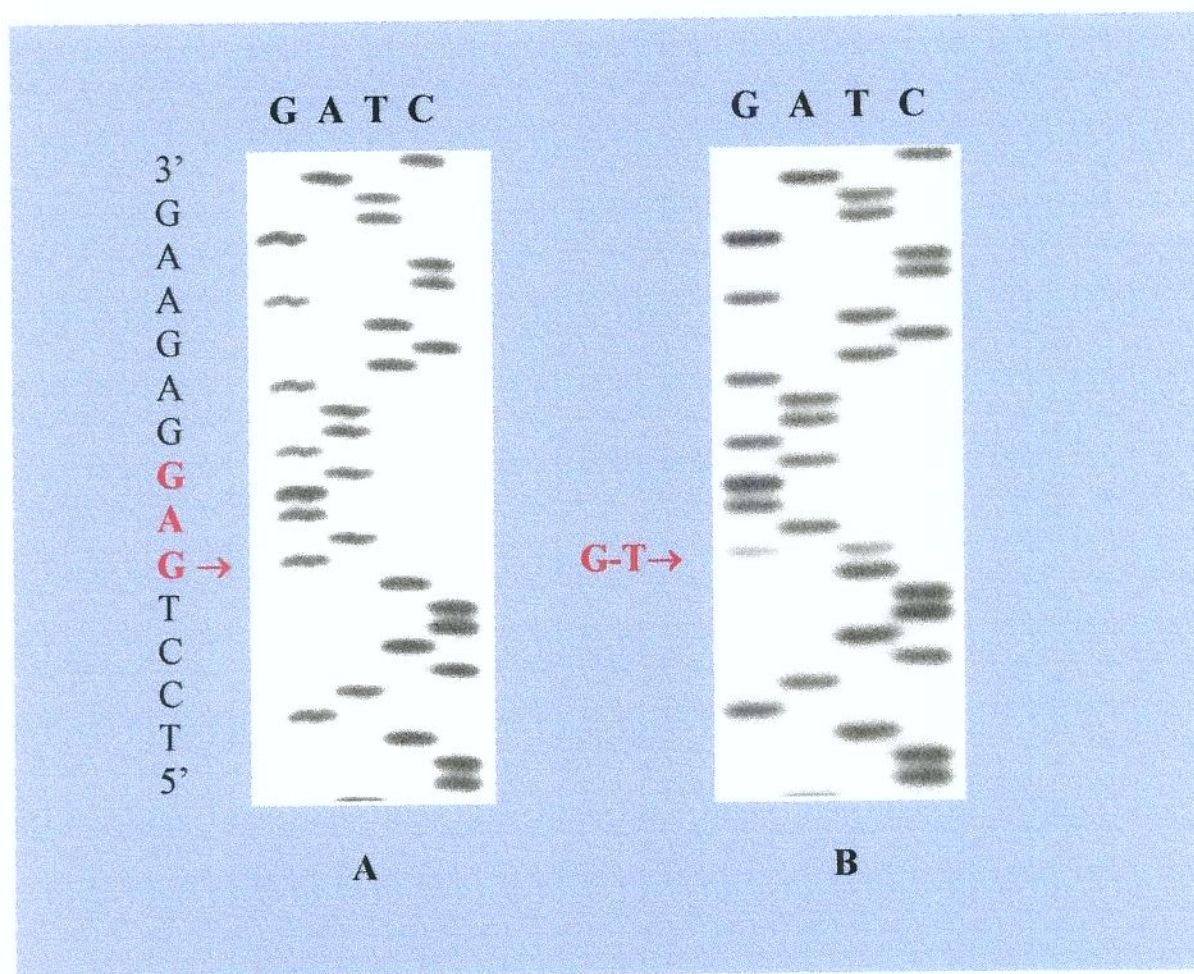


**Fig. 9.** Sequenciamento de DNA controle (A) e da paciente C/ $\beta^0$  talassemia (B). Encontra-se representada a substituição de GAG→AAG no codon 6 do gene da globina  $\beta$ , que resulta na Hb C. Também no primeiro nucleotídeo do codon 6 há uma substituição de um G→T, determinando o aparecimento de um “stop codon” (TAG), mutação esta responsável pela talassemia  $\beta^0$ .





**Fig. 10.** Sequenciamento de DNA controle (A) e da mãe da paciente (B) indicando a substituição de GAG→AAG no codon 6 do gene da globina  $\beta$ , que resulta na Hb C.



**Fig. 11.** Sequenciamento de DNA controle (A) e do pai da paciente (B) indicando a substituição, em heterozigose, de G→T no primeiro nucleotídeo do codon 6 do gene da globina  $\beta$ , com a criação do “stop codon”.



## Paciente 6

Paciente de 2 anos de idade, sexo masculino, encaminhado para investigação da presença de Hb C. Os dados hematológicos encontram-se na tabela 6.

**Tabela 6.** Valores hematológicos do paciente.

|            | GV<br>(x10 <sup>12</sup> /l) | Hb<br>(g/dl) | Ht<br>(%) | VCM<br>(fl) | HCM<br>(pg) | Hb F<br>(%) | Hb C<br>(%) |
|------------|------------------------------|--------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Paciente 6 | 5,25                         | 13,8         | 40        | 76,9        | 26          | 1,1         | 41          |

A eletroforese em pH alcalino demonstrou a presença da hemoglobina C e de uma hemoglobina com migração mais rápida que a hemoglobina A, embora não fosse nítida a separação destas 2 bandas. A eletroforese em pH ácido mostrou a presença de hemoglobina C e de uma outra banda, com migração próxima à hemoglobina F. A eletroforese das cadeias de globina evidenciou a variante  $\beta^C$  e uma outra variante de cadeia  $\beta$ , com migração mais lenta que a normal.

A amostra de DNA do paciente foi amplificada pela PCR com 2 pares de “primers”. O primeiro par gerou um fragmento de 771 pb, que incluía os “exons” 1 e 2 (“primers” P1 e P5 - tab.2). O segundo par (“primers” 229 e 230 - tab. 2) gerou um fragmento de 630 pb que incluía o “exon” 3.

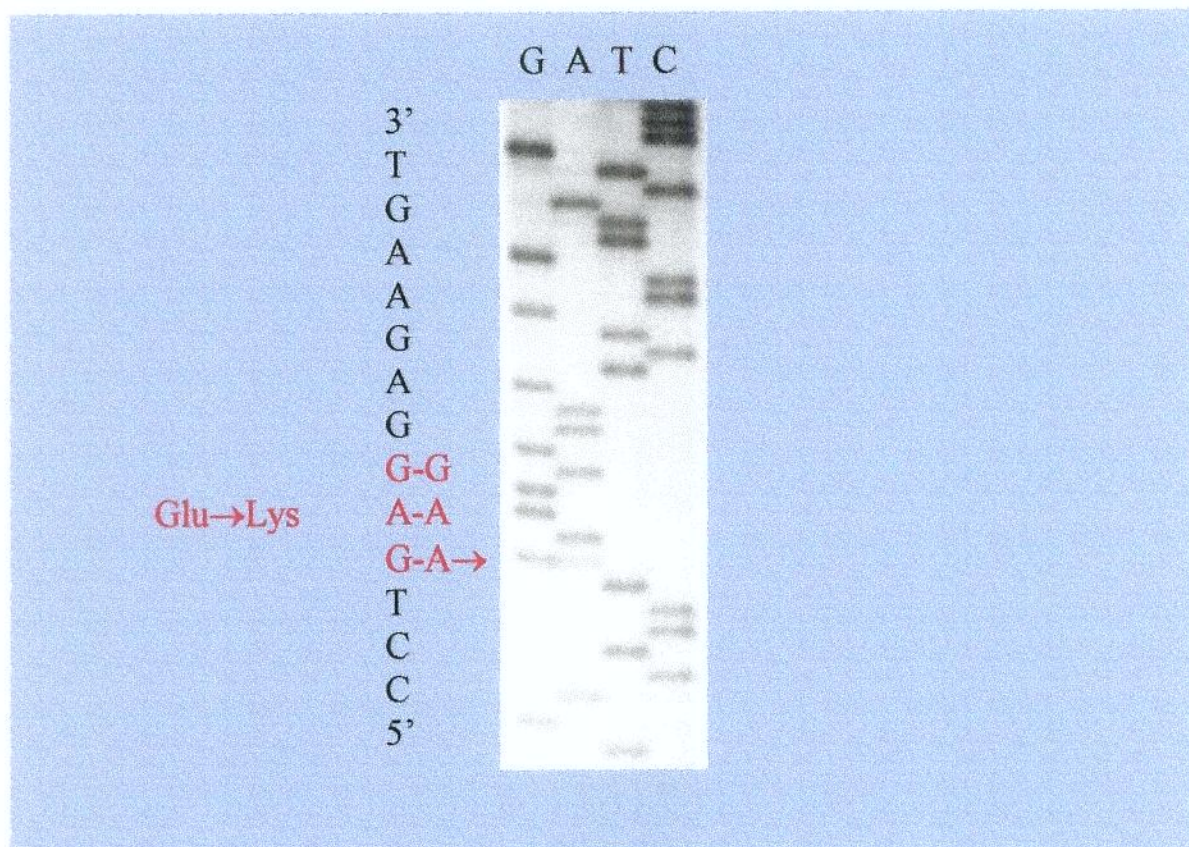
A reação de sequenciamento foi conduzida com os “primers” 108 e 109 para o fragmento de 771 pb e os “primers” 58 e P7 para o fragmento de 630 pb.

Na figura 12 podemos observar que no codon 6 existem duas bandas paralelas (G e A), confirmando a mutação da Hb C (GAG→GAA).

Alem disso, a figura 13 demonstra a existência, na terceira posição do “codon” 104, de duas bandas situadas na mesma posição (G e C), indicando claramente a existência de dois nucleotídeos nessa região, que resulta na substituição de arginina para serina (AGG→AGC). Esta mutação é responsável pela Hb Camperdown descrita em descendentes italianos (Wilkinson et al, 1975; Zhao et al, 1990; Miranda et al, 1996; Debernardi et al, 1996).

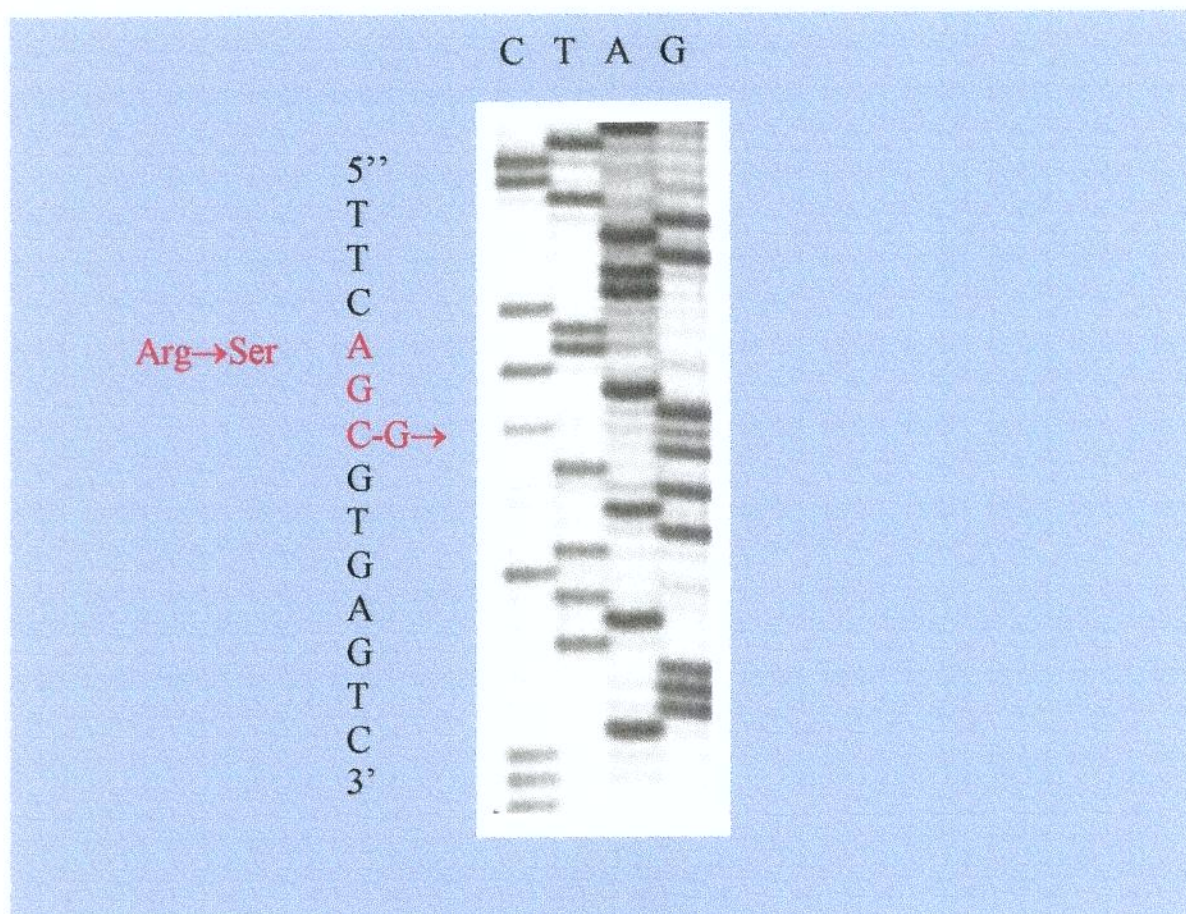
Portanto, o paciente 6 apresenta as hemoglobinas C e Camperdown, interação não descrita previamente.





**Fig. 12.** Sequenciamento do fragmento de DNA da paciente 6, amplificado com os “primers” P1 e P5 e sequenciado com o “primer” 108. A substituição de GAG - AAG no codon 6 do gene da globina  $\beta$ , que resulta na alteração do aminoácido ácido glutâmico para lisina (Hb C) encontra-se representada.





**Fig. 13.** Sequenciamento do fragmento de DNA da paciente 6, amplificado com os “primers” P1 e P5 e sequenciado com o “primer” 109. A substituição de AGG - AGC no codon 104 do gene da globina  $\beta$ , que resulta na Hb Camperdown ( $\beta$ 104Arg→Ser) encontra-se representada.

## Paciente 7

Paciente com descendência africana, 28 anos de idade, sexo masculino, encaminhado para investigação de anemia com os dados laboratoriais da tabela 7.

**Tabela 7.** Valores hematológicos do paciente e família.

|          | GV<br>( $\times 10^{12}/l$ ) | Hb<br>(g/dl) | Ht<br>(%) | VCM<br>(fl) | HCM<br>(pg) | Hb F<br>(%) | Hb A <sub>2</sub><br>(%) | Solubili-<br>dade (%) | Reticulócitos % |
|----------|------------------------------|--------------|-----------|-------------|-------------|-------------|--------------------------|-----------------------|-----------------|
| Paciente | 4,67                         | 12,7         | 38,5      | 82,4        | 27,2        | 1,4         | 2,9                      | 79,2                  | 3,0             |
| Pai      | 4,89                         | 15,2         | 45,2      | 92,4        | 31,1        | 1,4         | 2,5                      | -                     |                 |
| Mãe      | 4,59                         | 13           | 39,9      | 86,8        | 28,4        | 0,7         | 3,0                      | 77,6                  | 3,3             |

A eletroforese em pH alcalino mostrou a presença das hemoglobinas normais e de uma banda anômala semelhante à da Hb S, que em pH ácido, apresentou uma migração eletroforética semelhante à da Hb A. Os testes de instabilidade térmica e em isopropanol foram positivos. Corpúsculos de Heinz foram detectados em esfregaços de sangue periférico do paciente (Dacie & Lewis, 1984). A eletroforese de cadeias de globina evidenciou uma variante de cadeia  $\beta$  com migração mais rápida que a normal.

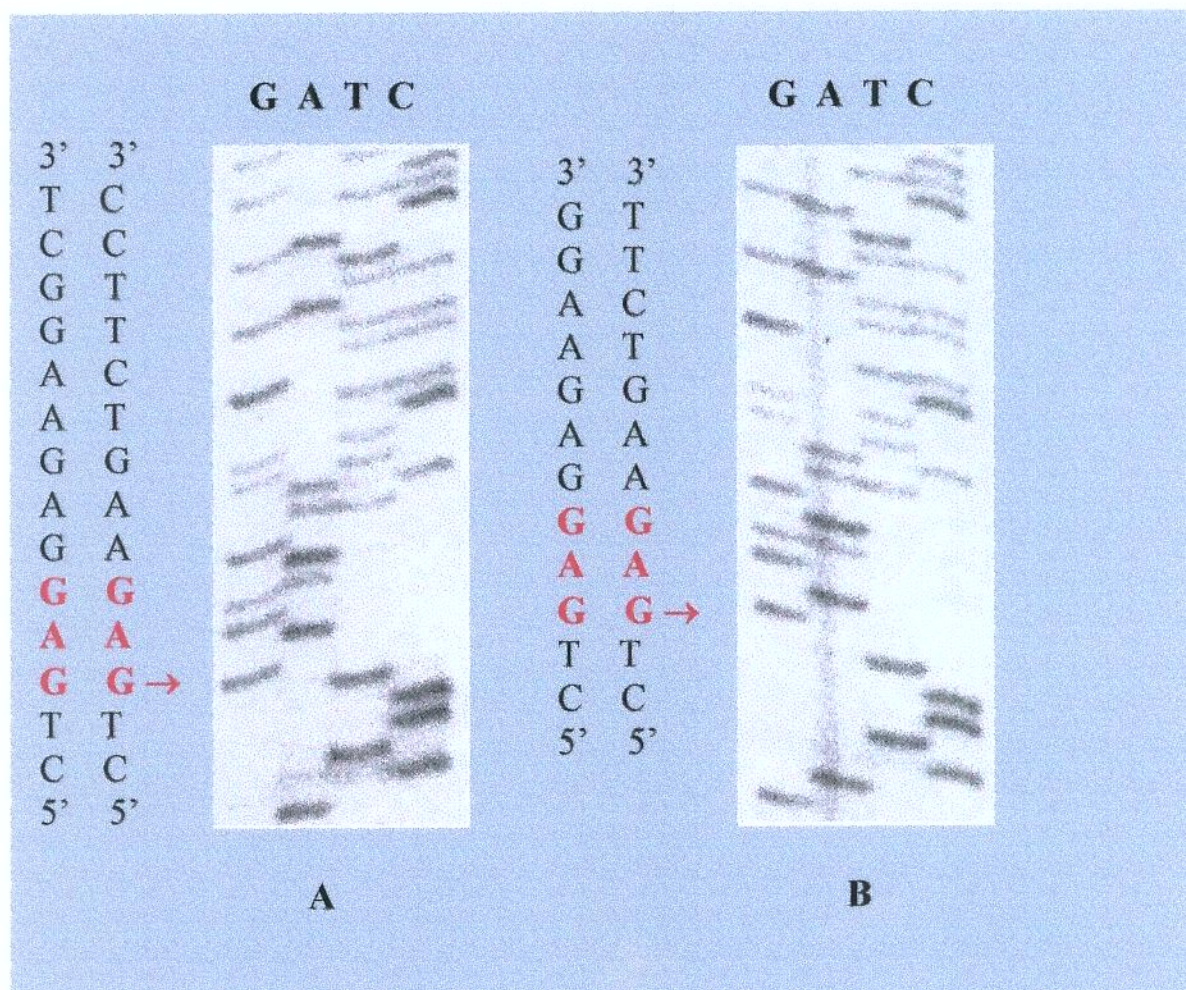
Com o objetivo de identificar a variante de cadeia  $\beta$ , a amostra de DNA do paciente foi amplificada com os “primers” P1 e P5 (tab. 2), gerando um fragmento de 771 pb, correspondente aos exons 1 e 2.

A reação de sequenciamento foi conduzida com o “primer” interno  $\beta 1$ . A figura 14 apresenta os resultados deste sequenciamento. Pode-se observar uma alteração na seqüência de DNA a partir do codon 6, indicando a presença, em

heterozigose, de uma deleção, que também ocorre na mãe do paciente. Uma leitura mais detalhada dos nucleotídeos desta região demonstrou a deleção de três bases, GAG, que pode ser tanto do codon 6 quanto do codon 7, ambos codificando ácido glutâmico. Esta alteração é responsável pela variante conhecida como Hb Leiden, onde há a perda do ácido glutâmico na posição 6 ou 7 da cadeia  $\beta$ .

Assim, o paciente e sua mãe são heterozigotos da Hb Leiden descrita primeiramente na Holanda (De Jong et al, 1968).





**Fig. 14.** Sequenciamento de DNA do paciente 7 (A) e de sua mãe (B). Encontra-se representada a deleção de GAG, em heterozigose, que pode estar nos codons 6 ou 7 do gene da globina  $\beta$  e que resulta perda do ácido glutâmico (Hb Leiden).

### Paciente 8 e doadores 9 e 10

Paciente 8, 4 anos de idade, branco, sexo masculino, com descendência italiana e síria, revelando anemia hipocrômica, microcítica, anisocitose e hemácias em alvo; doador 9, 19 anos de idade, negro, sexo feminino e assintomático; doador 10, 24 anos de idade, negro, sexo feminino e assintomático.

Os dados hematológicos dos indivíduos encontram-se na tabela 8.

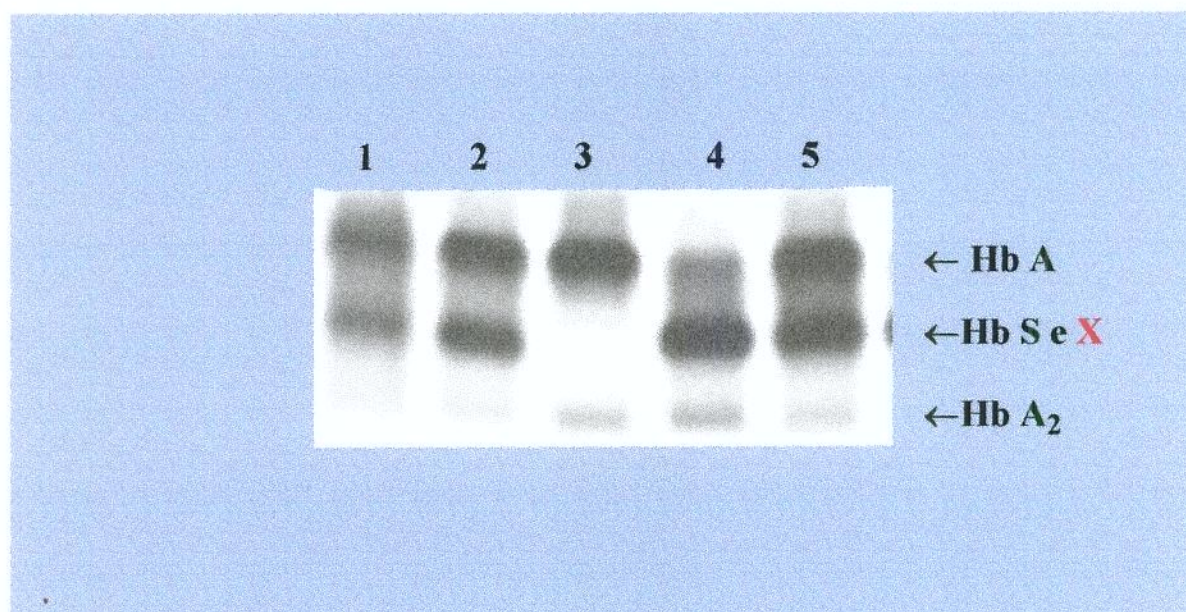
**Tabela 8.** Valores hematológicos dos indivíduos.

| Paciente | GV<br>( $\times 10^{12}/l$ ) | Hb<br>(g/dl) | VCM<br>(fl) | HCM<br>(pg) | Hb F<br>(%) | Hb A <sub>2</sub><br>(%) | Solubili-<br>dade (%) |
|----------|------------------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|--------------------------|-----------------------|
| 8        | 5,1                          | 8,8          | 54          | 17          | 1,7         | 3,9                      | 90,4                  |
| 9        | 5,2                          | 12,2         | 71,1        | 23,3        | -           | -                        | -                     |
| 10       | 5,0                          | 13           | 91          | 31,2        | -           | -                        | -                     |

Nos 3 casos, a eletroforese em pH alcalino apresentou um padrão semelhante ao da hemoglobina S (fig. 15) e a eletroforese em pH ácido apresentou uma migração eletroforética semelhante à da hemoglobina A (fig. 16).

A eletroforese das cadeias de globina evidenciou uma variante de cadeia  $\beta$  com migração mais rápida que a normal, além das bandas normais. (fig. 17).



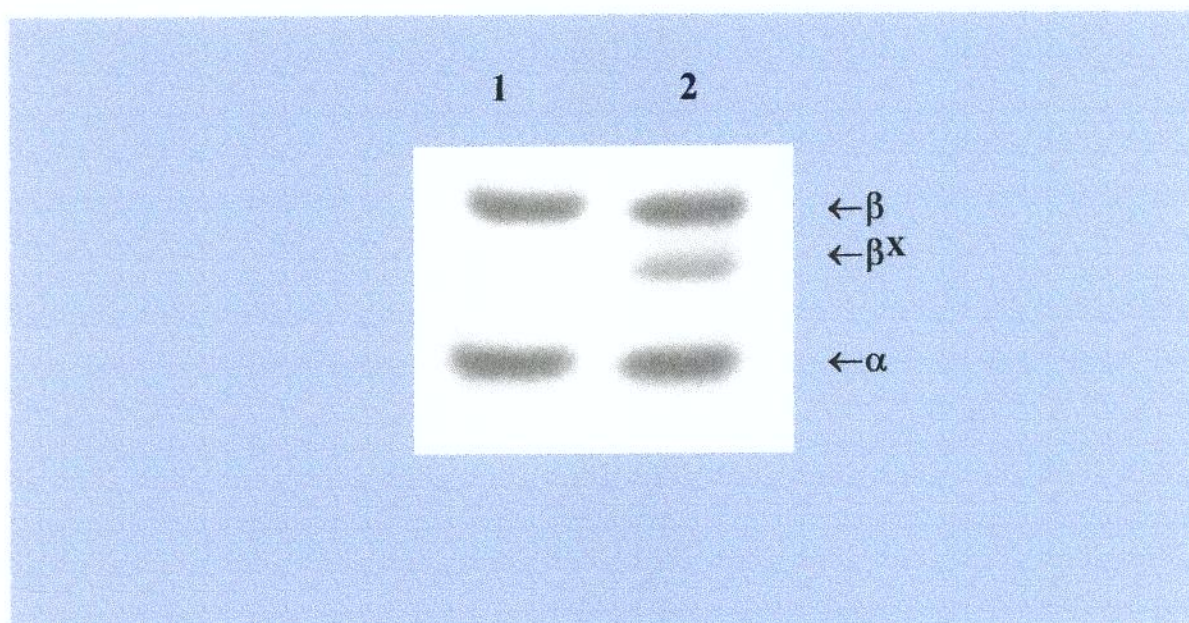


**Fig. 15.** Padrão de bandas detectado por eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose, tampão Tris-EDTA-borato pH 8,9. 1. controle heterozigoto da Hb S 2. Doador 9 3. controle normal 4. Paciente 8 5. Doador 10.





**Fig. 16.** Padrão de bandas detectado por eletroforese de hemoglobina em gel de agar, pH ácido. **1.** controle normal **2.** Controle AS **3.** Paciente 8 **4.** Doador 9 **5.** Doador 10.



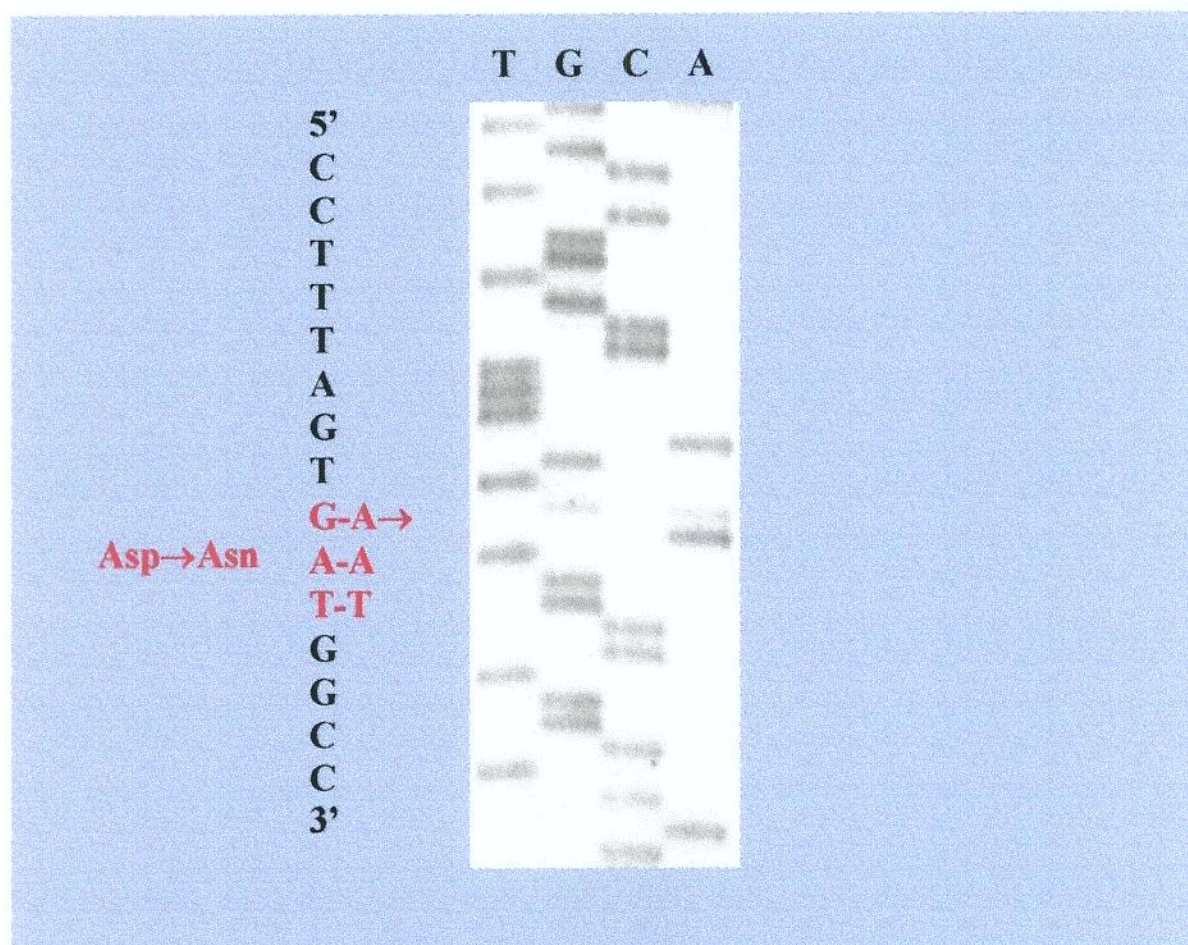
**Fig. 17.** Padrão de bandas detectado por eletroforese de cadeias de globinas. **1.** controle normal **2.** Doador 9.



Com o objetivo de identificar a proteína anômala foram levados a efeito os sequenciamentos dos três exons do gene da globina  $\beta$ . Um fragmento de 771 pb, correspondente aos exons 1 e 2, amplificados com os “primers” P1 e P5 foi sequenciado com o “primer” interno 109 e revelou, nos 3 casos, o padrão observado na figura 18. Na primeira posição do “codon” 73 existem duas bandas situadas na mesma altura (G e A), revelando claramente a existência de dois nucleotídeos nessa região. Esse achado indica que, concomitantemente ao “codon” GAT (ácido aspártico) temos o “codon” AAT (asparagina); esta variante ( $\beta 73 \text{ Asp} \rightarrow \text{Asn}$ ) é conhecida como hemoglobina Korle Bu, frequentemente encontrada na África central (Lehmann et al, 1964; Konotey-Ahulu et al, 1968).

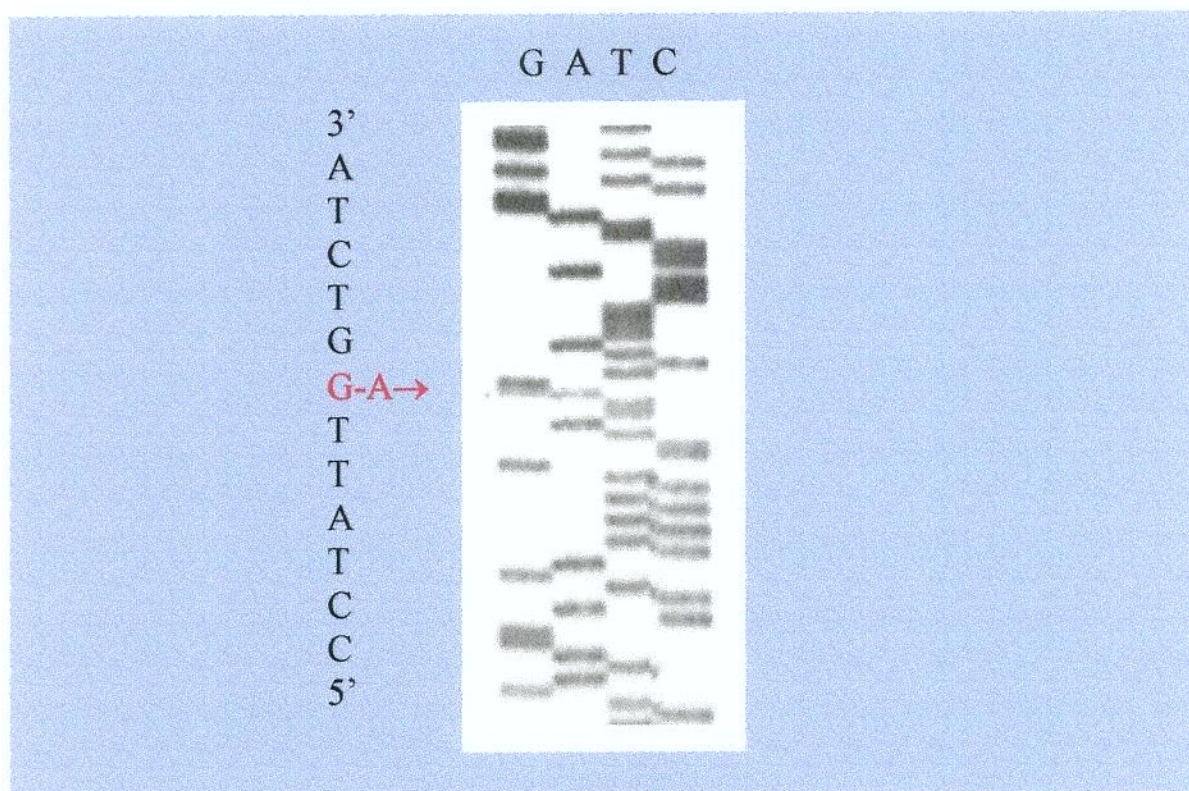
Em relação ao paciente 8, os dados hematológicos sugeriam também a presença de talassemia  $\beta$ . Com o intuito de verificar qual a alteração que causaria a deficiência de síntese da cadeia  $\beta$ , o amplificado obtido com os “primers” P1 e P5 foi sequenciado com o “primer”  $\beta 1$  (fig. 19). Na posição 110 do “intron” 1 existem duas bandas situadas na mesma altura (G e A), indicando a presença da mutação  $\beta^+ \text{IVS1-110}$ . Esta alteração cria uma sequência alternativa de clivagem “cryptic site”, de forma que 90% dos eventos de clivagem usam o novo sítio e só 10% usam o local correto, resultando em talassemia  $\beta^+$ .

Portanto, os doadores 9 e 10 são heterozigotos da Hb Korle Bu e o paciente 8 apresenta uma interação da hemoglobina Korle Bu com a talassemia  $\beta^+ \text{IVS1-110}$ , interação esta não descrita previamente.



**Fig. 18.** Sequenciamento do fragmento de DNA do doador 10, amplificado com os primers P1 e P5 e sequenciado com o primer 109. Encontra-se representada a substituição de G-A no codon 73, indicando a existência de dois codon GAT-AAT(Hb Korle-Bu Asp→Asn).





**Fig. 19.** Sequenciamento do fragmento de DNA do paciente 8, amplificado com os primers P1 e P5 e sequenciado com o primer  $\beta 1$ . Encontra-se representada a substituição de G-A na posição 110 do intron 1 do gene da globina  $\beta$ .

## Paciente 11

Paciente branco, 32 anos de idade, sexo masculino, descendência italiana, encaminhado para esclarecimento de anemia hipocrômica e microcítica. Os dados laboratoriais do paciente encontram-se na tabela 9.

**Tabela 9.** Valores hematológicos do paciente.

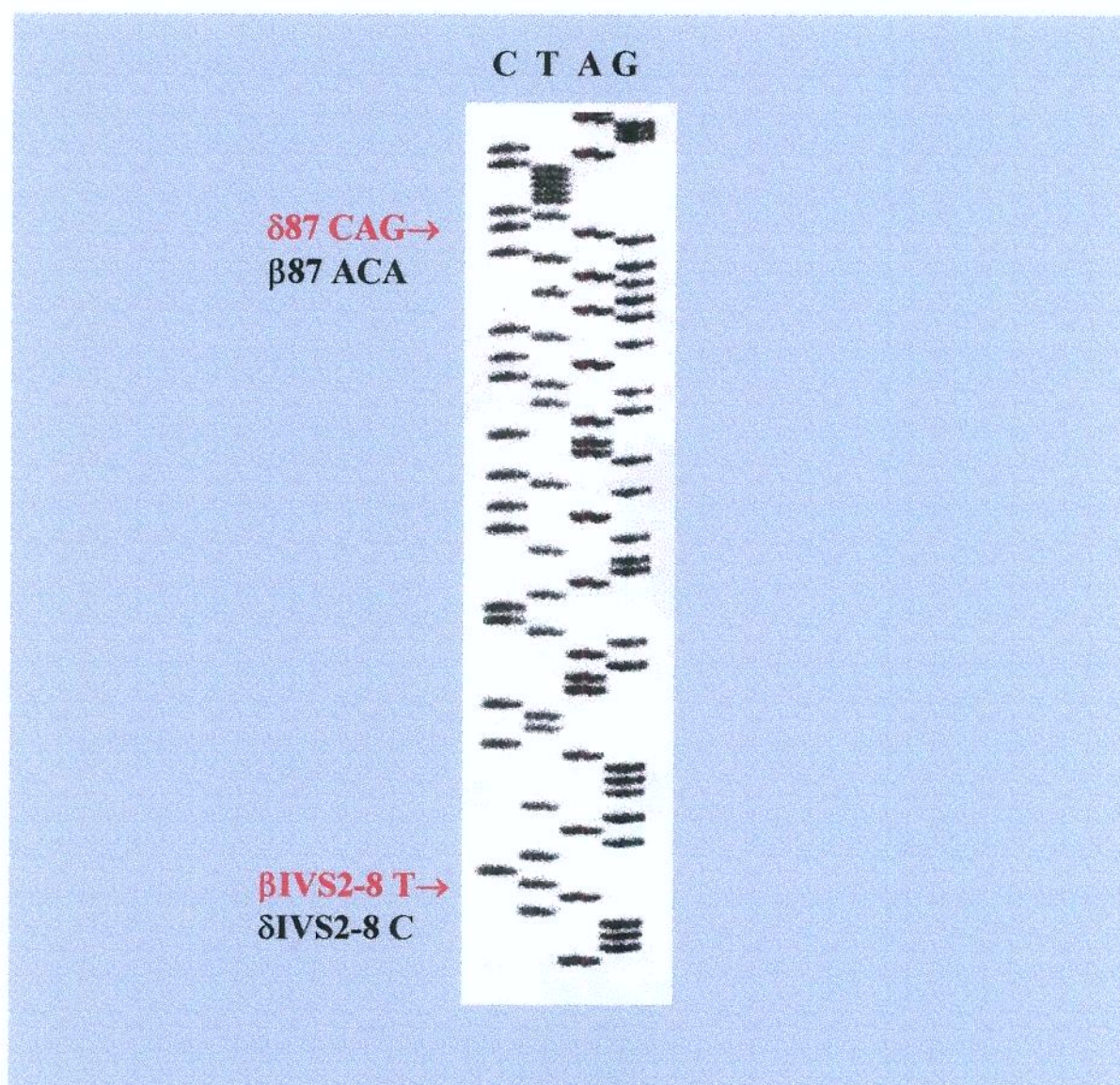
|     | GV<br>( $\times 10^{12}/l$ ) | Hb<br>(g/dl) | Ht<br>(%) | VCM<br>(fl) | HCM<br>(pg) | Hb F<br>(%) | Hb<br>A <sub>2</sub><br>(%) | Reticuló<br>citos<br>(%) | Solubili-<br>dade (%) |
|-----|------------------------------|--------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Pac | 6,15                         | 12,9         | 41,5      | 68          | 20,9        | 0,9         | 2,0                         | 1,5                      | 84                    |

A eletroforese revelou que 8,6 % da hemoglobina era anormal, com um padrão semelhante ao da Hb S e solubilidade normal. A migração no gel de agar foi semelhante à da Hb A. Em seu conjunto, os dados hematimétricos, com microcitose e hipocromia, aliados ao padrão eletroforético (8,6% de Hb com migração na posição de S) sugeriram a possibilidade de se tratar da hemoglobina Lepore.

Com o objetivo de identificar esta variante, o gene híbrido  $\delta$ - $\beta$  foi amplificado empregando-se um “primer sense” 303, complementar à região 5’ do gene da globina  $\delta$  (tab. 3), localizado na posição -39 com relação ao sítio Cap, e um “primer antisense” P7, complementar à região 3’ do gene da globina  $\beta$  (tab. 2), localizado na posição +1645 com relação ao sítio Cap. A reação produziu um fragmento de 1,7 Kb somente na amostra de DNA do portador da hemoglobina anômala, sendo negativa nos indivíduos controles.



O sequenciamento direto do DNA com o “primer” P5 demonstrou uma seqüência correspondente ao gene da globina  $\delta$  até o codon 87, enquanto a primeira base específica do gene da globina  $\beta$  foi observada na oitava posição do intron 2 (IVS2-8) (Fig. 20). Estes dados demonstram que a mutação é do tipo Hb Lepore Boston-Washington, pois o resíduo de aminoácido correspondente ao codon  $\delta$  87 é glutamina e ao codon  $\beta$  116 é histidina, conforme referências da literatura (Baglioni, 1962, 1965). Os dados de seqüência de nucleotídeos indicam que o ponto de ocorrência do crossing-over no paciente estudado, encontra-se dentro da região compreendida entre o codon  $\delta$  87 e a posição  $\beta$  IVS2-8.



**Fig. 20.** Sequenciamento do fragmento de DNA do paciente 11, amplificado com os primers 303 e P7 e sequenciado com o primer P5. Indicados pelas setas o codon 87, que corresponde ao gene da globina  $\delta$  (CAG), e a posição IVS2-8 do gene da globina  $\beta$  (T), [Hb Lepore Boston-Washington  $\delta 87$  (Gln)  $\beta 116$  (His)].

## Paciente 12

Paciente com 4 anos de idade, branco, sexo masculino, descendência italiana, assintomático, com anemia leve, hipocrômica e microcítica revelada através de exames de rotina. Em acompanhamento no Ambulatório de Hematologia do Hemocentro da UNICAMP. Na família, a mãe apresentava um quadro clínico semelhante.

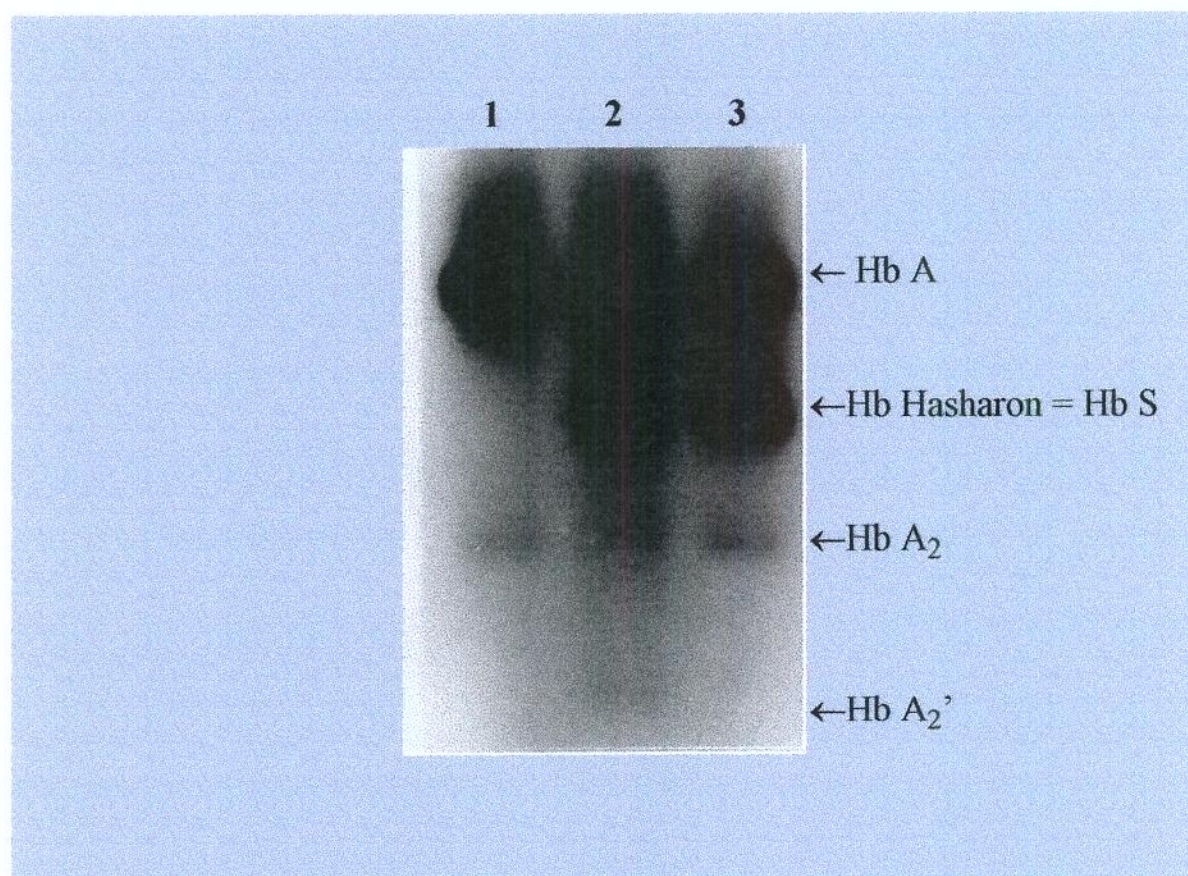
Os parâmetros hematológicos estão apresentados na tabela 10.

**Tabela 10.** Valores hematológicos do paciente e família.

|          | GV<br>x10 <sup>12</sup> /l | Hb<br>g/dl | VCM<br>fl | HCM<br>pg | RD<br>W % | Solub<br>. % | HbA <sub>2</sub><br>%                      | HbF<br>% | Padrão<br>eletrof.                                                              |
|----------|----------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|--------------|--------------------------------------------|----------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Paciente | 5.47                       | 12.3       | 70        | 22.5      | 15.7      | 93           | A <sub>2</sub> ' 0.5<br>A <sub>2</sub> 0.8 | 0.8      | A <sub>2</sub> 'A <sub>2</sub> XA<br>X 21%<br>αα <sup>x</sup> ββ <sup>x</sup>   |
| Mãe      | 5.36                       | 9.6        | 59        | 18        | 23.8      | 95           | A <sub>2</sub> ' 0.5<br>A <sub>2</sub> 0.8 | 0.6      | A <sub>2</sub> 'A <sub>2</sub> XA<br>X 20.8%<br>αα <sup>x</sup> ββ <sup>x</sup> |
| Pai      | 5.67                       | 16.5       | 83        | 29.1      | 14.1      | 95           | 2.6                                        | 0.4      | A <sub>2</sub> A                                                                |
| irmã     | 5.39                       | 14.8       | 80        | 27.4      | 14.4      | -            | 2.9                                        | 0.4      | A <sub>2</sub> A                                                                |

A eletroforese em pH alcalino demonstrou a presença de duas bandas anômalas, uma semelhante à da Hb S e outra correspondente à Hb A<sub>2</sub>', além das bandas normais (fig. 21).





**Fig. 21.** Padrão eletroforético das hemoglobinas em pH alcalino. **1.** controle normal AA **2.** paciente 12 **3.** controle AS.

A separação das cadeias de globina em eletroforese de poliacrilamida-uréia-triton X evidenciou uma variante de cadeia  $\alpha$  com migração mais rápida que a normal e uma variante de cadeia  $\beta$  com migração mais lenta que a normal (fig. 22).

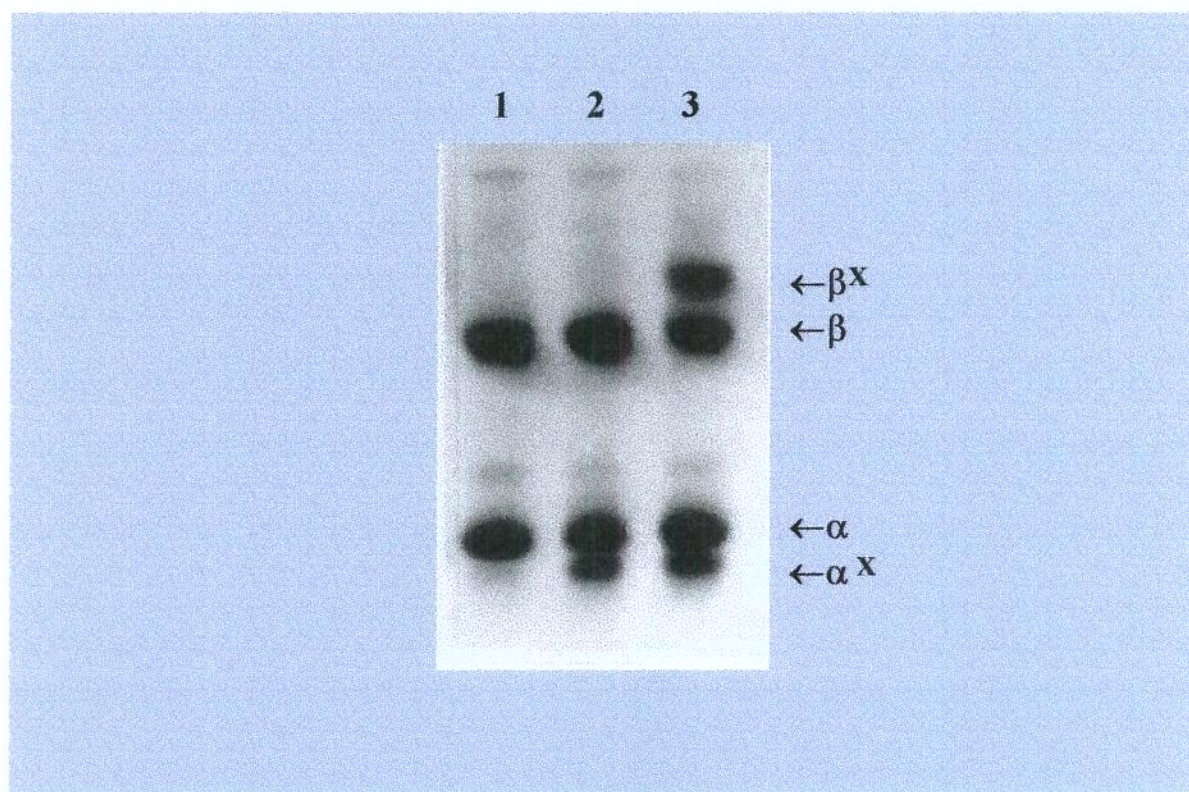
O estudo das anormalidades moleculares desta família foi conduzido pela análise do DNA através do sequenciamento direto dos genes  $\alpha$  e  $\beta$  após amplificação pela PCR, e identificação da heterozigose da talassemia  $\alpha^+$  pela PCR.

A análise do gene  $\alpha$  mostrou que o paciente e a mãe são heterozigotos da Hb Hasharon ( $\alpha 47$  Asp $\rightarrow$ His) e da  $\alpha$ -talassemia 2 ( $-\alpha^{3.7}$ ).

Com o objetivo de identificar a variante de cadeia  $\beta$ , a amostra de DNA do paciente foi amplificada a partir dos “primers” P1 e P5 (tab. 2), gerando um fragmento de 771 pb, correspondente aos “exons” 1 e 2. A reação de sequenciamento foi conduzida com o “primer” interno 109. Podemos observar na figura 23, que na primeira posição do codon 34 da reação do paciente existem duas bandas paralelas (G e A) enquanto no controle há apenas uma banda (G), indicando claramente a existência de dois nucleotídeos nessa região. Isto revela que, concomitante ao codon GTG (Valina), há o codon ATG (metionina).

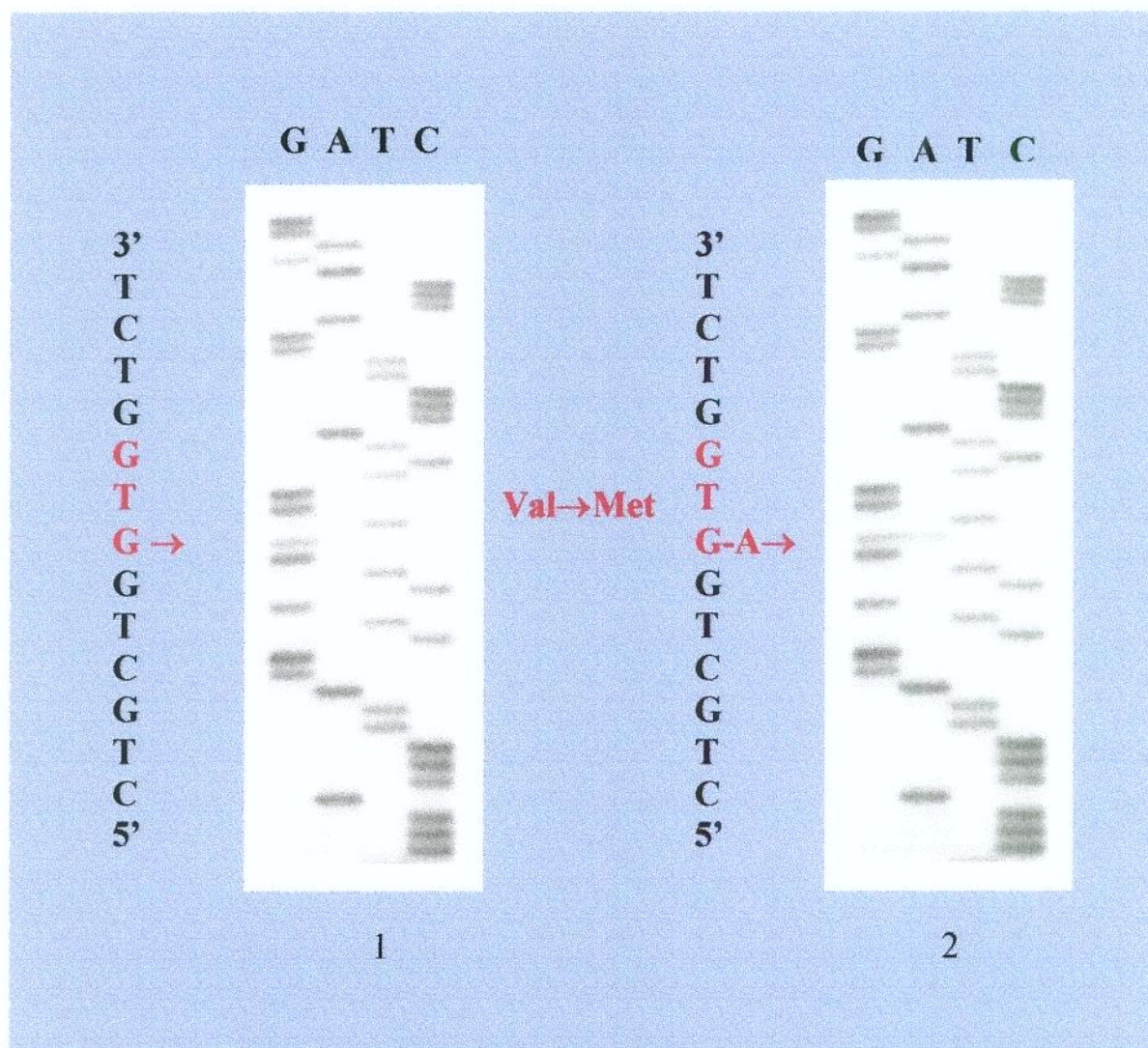
Este tipo de alteração não havia sido previamente descrita; a nova variante foi denominada Hb Rio Claro [ $\beta 34$  (B16) Val $\rightarrow$ Met], dada a origem do paciente, e foi encontrada em associação a 2 alterações dos genes  $\alpha$ : a Hb Hasharon ( $\alpha 47$  Asp $\rightarrow$ His) e a  $\alpha$ -talassemia 2 ( $-\alpha^{3.7}$ ), o paciente e em sua mãe.





**Fig. 22.** Padrão de bandas detectado por eletroforese de cadeias de globinas. **1.** controle normal **2.** Heterozigoto da Hb Hasharon **3.** Paciente 12.





**Fig. 23.** Sequenciamento do fragmento de DNA controle (1) e de Portador de Hb Rio Claro (2), amplificado com os primers P1 e P5 e sequenciado com o primer 109. Indicada pela seta o primeiro nucleotídeo do codon 34, onde ocorre uma banda dupla G-A. Este achado indica a presença de dois codons GTG (valina) e ATG (metionina) nessa posição.

## DISCUSSÃO

Algumas das variantes estruturais de hemoglobinas mais frequentes, como a Hb S e a Hb C, podem ser identificadas através de métodos eletroforéticos simples e teste de solubilidade em tampão fosfato de alta concentração. Entretanto, para a identificação de variantes menos frequentes, os procedimentos envolvendo os diferentes tipos de eletroforese não são suficientes. Nesses casos, em geral, são necessários o isolamento da cadeia da globina anômala, a separação em cromatografia líquida de alta resolução dos peptídeos e a análise de aminoácidos das frações anormais (Sick et al., 1967; Rahbar et al., 1991; Wajcman et al., 1991a e b). Esse tipo de análise é complexo, consome considerável tempo em sua realização e requer equipamentos dispendiosos.

Outra abordagem para a caracterização de hemoglobinas anormais seria a análise molecular com o emprego de amostras de DNA ou RNA. Algumas variantes podem ser identificadas por digestão com endonucleases de restrição, pois essas mutações abolem ou criam sítios de reconhecimento dessas enzimas. A amplificação do gene pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e a hibridização com oligonucleotídeos alelo-específicos (ASO) também podem ser empregadas (Fischel-Ghodsian et al., 1990; Curuk et al., 1992). Porém, estes métodos não são úteis na caracterização de mutações incomuns. Nestes casos, a única abordagem possível está baseada em métodos que conduzem ao sequenciamento dos genes envolvidos.

Nos pacientes deste estudo, a caracterização das hemoglobinas anormais foi levada a efeito pelo sequenciamento de DNA, o qual permitiu o reconhecimento de diversas hemoglobinas variantes.

Até janeiro de 1996, o número de variantes de cadeia  $\delta$  descritas era de somente 28 (IHIC). Este número é relativamente pequeno, principalmente em função da dificuldade na identificação de substituições de aminoácidos em proteínas que ocorrem em pequenas quantidades em heterozigotos (Li et al, 1991).

No Brasil, apenas foram detectadas variantes da globina  $\delta$ , denominadas hemoglobinas  $A_2'$ , mas não foram feitas as suas caracterizações moleculares (Sonati et al, 1996). A Hb  $A_2'$  (B2) é a mais comum das variantes de cadeia  $\delta$  descritas, foi encontrada principalmente em famílias negras, e observado em heterozigose, homozigose e em combinação com as Hbs S, C e talassemia  $\beta$  (Pearson et al, 1965; Ball et al, 1966; Codrington et al, 1990).

Neste trabalho descrevemos 3 casos de Hb  $A_2'$ B2, sendo um em combinação com a Hb S. Estes são os primeiros casos de  $A_2'$  caracterizados molecularmente na população brasileira.

O paciente 6 foi demonstrado ser portador da associação das hemoglobinas C e Camperdown, que não ocasionou manifestações clínicas significativas. Este tipo de associação é o primeiro descrito na literatura e o segundo relato de Hb Camperdown na população brasileira, tendo o primeiro sido feito por Miranda et al (1996). A posição G6 na globina  $\beta$  é ocupada por uma arginina; este resíduo tem um papel importante na estrutura tetramérica da hemoglobina, contribuindo para sua estabilidade (Perutz, 1987). Por isto não é surpreendente que a Hb Camperdown ( $\beta 104\text{Arg} \rightarrow \text{Ser}$ ) demonstre um certo grau de instabilidade. Não obstante, os portadores dessa variante não apresentem alterações clínicas significativas (Wilkinson et al, 1975).

A Hb Camperdown foi encontrada primeiramente em uma família Maltese vivendo na Austrália, e em descendentes italianos (Wilkinson et al, 1975; Zhao et al, 1990; Miranda et al, 1996; Debernardi et al, 1996).



O paciente 7 e sua mãe foram identificados como portadores da hemoglobina de Leiden; estes são os primeiros casos descritos na população brasileira e é a primeira vez que a alteração (deleção dos nucleotídeos GAG dos codons 6 ou 7 da globina  $\beta$ ) é identificada a nível molecular. A Hb Leiden  $\beta 6(A3)$  ou  $\beta 7(A4)\text{Glu}\rightarrow 0$  foi identificada na Holanda, sul da África, México e Yugoslavia (De Jong et al, 1968; Perlman et al, 1981; Juricic et al, 1983). É uma hemoglobina instável, com afinidade pelo oxigênio ligeiramente elevada, levando a reticulocitose e a anemia hemolítica moderada; as conseqüências podem ser mais graves quando induzidas por drogas, infecções virais ou quando a variante for encontrada em associação com  $\beta^0$  talassemia (Nagel et al, 1973; Lie-Injo et al, 1977; Schroeder et al, 1982).

A Hb Korle-Bu, também conhecida como G-Accra, foi descrita inicialmente em Ghana e subsequentemente em famílias da África central. Não resulta em manifestações clínicas ou hematológicas, tanto em heterozigose, como em homozigose (Konotey-Ahulu et al 1968; Lehmann et al, 1964; Labie et al, 1974). Esta variante foi descrita em associação com a Hb S (Elizondo et al, 1976) e com a Hb C, resultando em anemia hemolítica moderada, microcítica, levando à aceleração na formação de cristais in vitro (Nagel et al, 1993).

Os pacientes 8, 9 e 10 representam os primeiros casos descritos portadores de Hb Korle-Bu na população brasileira e também o primeiro estudo em que a alteração  $\beta 73 \text{ Asp-Asn (GAT}\rightarrow\text{AAT)}$  foi demonstrada pela análise de DNA. Além disso, o paciente 8, caucasóide de descendência italiana, apresentou a associação da Hb Korle-Bu com a  $\beta^+$  talassemia (IVS1-110), associação esta ainda não descrita previamente.

O estado heterozigótico das variantes do tipo Lepore apresenta características clínicas e hematológicas semelhantes as da talassemia  $\beta$

heterozigótica, enquanto os homozigotos apresentam forma grave de anemia, associada à ausência de síntese de cadeias  $\beta$  (Bunn & Forget, 1986). Esta hemoglobina anormal foi previamente identificada por análise peptídica, a qual não permite o reconhecimento preciso da região do “crossing over”. Estudos de mapeamento gênico dos três tipos de hemoglobina Lepore permitiram estreitar a região envolvida na recombinação, mas somente dados de sequenciamento de DNA podem fornecer informações precisas referentes ao ponto de quebra (Metzenberg et al., 1991).

No paciente 11, o fragmento de 1,7 Kbs obtido na reação de PCR comprova a presença do gene mutante híbrido, resultado da fusão da porção 5' do gene da globina  $\delta$  e a porção 3' do gene da globina  $\beta$ . Uma vez que esses genes encontram-se separados por cerca de 7 Kilobases, somente o gene híbrido é amplificado em uma reação normal de PCR.

Os dados de sequenciamento indicam que se trata da variante Lepore Boston-Washington, onde o ponto de quebra no “crossing over” foi inicialmente descrito com base na análise de aminoácidos ( $\delta 87\text{Gln} - \beta 116\text{His}$ ) (Baglioni 1962). Posteriormente, ele foi delimitado às posições  $\delta 87 - \beta \text{IVSII-8}$  pela análise de DNA (Fioretti et al, 1992). Vários estudos tem demonstrado que a Hb Lepore-Boston-Washington é a variante Lepore predominante na Itália (Camachella et al, 1989; Fioretti et al 1992, Pagano et al, 1997), mas também encontrada em outras populações (Yamashiro et al, 1997; Ibarra et al, 1997; Ribeiro et al, 1997) e em associação com as Hbs S, C e  $\beta$ -talassemia (Romana et al, 1997; Efremov et al, 1988).

Neste estudo a região de “crossing over” da Hb Lepore-Boston-Washington foi confirmada entre  $\delta 87 - \beta \text{IVSII-8}$ , este é o primeiro caso descrito na população brasileira.

A maioria das 700 hemoglobinas variantes foram originalmente detectados pela migração eletroforética anormal. Porém, uma proporção significativa é causada pela substituição de aminoácidos que não alteram a carga elétrica da proteína e só podem ser detectados por outros métodos (Moo-Penn et al, 1980; Nakatsuji et al, 1981; Jones et al, 1990).

Neste trabalho identificamos uma nova variante, eletroforeticamente silenciosa, detectada pela eletroforese de cadeias de globina (paciente 12 e sua mãe). Esta nova variante foi identificada como  $\beta 34(B16)Val-Met$ , denominada Hb Rio Claro, e encontrada em associação com Hb Hasharon ( $\alpha 47 Asp \rightarrow His$ ) e alfa talassemia-2 ( $-\alpha^{3.7}$ ). A posição  $\beta 34$  está envolvida nos contatos  $\alpha 1\beta 1$  e mutações nesta posição podem afetar tanto a afinidade pelo oxigênio quanto a estabilidade da molécula (Blouquit et al, 1980). Apenas uma variante foi anteriormente descrita na posição  $\beta 34$ , denominada Hb Pitie-Salpetriere ( $Val \rightarrow Phe$ ), que possui grande afinidade pelo oxigênio, instabilidade e resulta em eritrocitose (Blouquit et al, 1980). A complexa associação do caso descrito, com a interação com a Hb Hasharon e a talassemia  $\alpha$ , deve estar contribuindo para a anemia moderada observada no paciente e em sua mãe.

As síndromes talassêmicas representam uma alteração genética comum, com ampla distribuição mundial, e elevadas frequências em populações da Bacia do Mediterrâneo, África, sudeste da Ásia e Índia (Waye et al, 1997). Geralmente são decorrentes de mutações de ponto no gene da globina  $\beta$ , sendo reconhecidas 160 distintas mutações (Baysal & Carver, 1995).

Ainda que a triagem de apenas quatro destas mutações permita o reconhecimento da maioria dos casos de talassemia  $\beta$  na população brasileira (Martins, 1993), a caracterização de mutações menos frequentes pode levar ao

conhecimento de distintas alterações moleculares, fundamental para o diagnóstico pré-natal e aconselhamento genético.

Nesse estudo descrevemos uma alteração rara na região promotora do gene da globina  $\beta$  (-88) e uma nova mutação de ponto afetando o codon 6 do mesmo gene, em uma paciente com C/ $\beta^o$  talassemia.

A paciente 4, de descendência árabe-holandesa, foi aqui identificada como portadora das alterações talassêmicas  $\beta^+$ -88 e  $\beta^+$ IVS1-110, cuja associação levou a um quadro clínico de talassemia intermediária. Este é o primeiro caso descrito no Brasil da mutação  $\beta^+$ -88. Esta mutação ( $\beta^+$ -88 C $\rightarrow$ T) é a segunda causa mais comum de talassemia  $\beta$  entre as populações negras, correspondendo a mais do que 20% dos alelos mutantes (Orkin et al, 1984; Gonzalez-Redondo et al, 1988) e tem sido descrita em associação com as hemoglobinas S e C (Gonzalez-Redondo et al, 1991; Romana et al, 1996). A substituição altera a sequência CACCC da região promotora do gene  $\beta$ , diminuindo parcialmente a produção de mRNA devido a uma diminuição da ligação dos fatores de transcrição (Waye et al, 1994).

Importante ressaltar que neste trabalho foi identificada uma nova mutação de ponto afetando o codon 6 no gene  $\beta$  (GAG $\rightarrow$ TAG), criando um “stop codon” em substituição ao codon normal (ácido glutâmico). Esta mutação, “nonsense”, foi encontrada na paciente 5, com HbC e  $\beta^o$  talassemia. Esta é a primeira mutação “nonsense” decrita no codon 6 da globina  $\beta$  e exemplifica a grande heterogeneidade dos defeitos moleculares na talassemia  $\beta$ .

O diagnóstico de certeza da interação entre o gene  $\beta^o$  e o gene  $\beta^C$  só é possível através do estudo familiar. Neste caso, a mãe da paciente era heterozigota da Hb C e o pai, descendente de italianos, heterozigoto da talassemia  $\beta$  ( $\beta^6$ GAG $\rightarrow$ TAG).

A terminação prematura da síntese de cadeias de globina devido à interrupção da tradução pode ser causada por mutações “nonsense” ou “frameshift”. Estas geralmente originam um produto instável, que é rapidamente degradado na célula (Huisman, 1990; Novelletto et al, 1990). Interessante observar que apenas 14 (8,75%) das 160 mutações de ponto na talassemia  $\beta$  resultam de mutações “nonsense” (Baysal & Carver, 1995). Além disso, no codon 6 (Glu), apenas 5 outras alterações moleculares são conhecidas, sendo 4 “missense” (Hb S, Hb C, Hb G-Makassar e Hb Machida) e uma “frameshift” (-A do codon GAG) (IHC,1996).



## CONCLUSÕES

Tomados em conjunto, os dados deste trabalho permitiram a caracterização molecular de 7 alterações de cadeia  $\beta$  e 1 alteração de cadeia  $\delta$ . Duas dessas alterações moleculares foram aqui descritas pela primeira vez na literatura, a Hb Rio Claro  $\beta^{34}(B16)\text{Val}\rightarrow\text{Met}$  e a alteração talassêmica  $\beta^{\circ 6}\text{Glu}\rightarrow\text{"stop codon"}$  ( $\text{GAG}\rightarrow\text{TAG}$ ). Além destes achados, três outras alterações estruturais: Hb Leiden, Hb Korle-Bu e Hb Lepore-Boston-Washington representam os primeiros casos descritos na população brasileira, sendo que as Hbs Leiden e Korle-Bu foram demonstradas pela primeira vez por análise molecular. Adicionalmente foi possível identificar a interação entre a Hb C e Hb Camperdown, a variante de cadeia  $\delta$  denominada Hb  $A_2'$ B2 e a alteração talassêmica  $\beta^{+88}$ .

RESUMO

As hemoglobinas humanas, compreendem um grupo de moléculas protéicas responsáveis pelo transporte de oxigênio dos capilares alveolares dos pulmões para os tecidos. As moléculas variantes de hemoglobinas são caracterizadas pela anormalidade estrutural de uma subunidade particular da globina e podem ou não resultar em alterações clínicas detectáveis. Existem alterações que levam a uma redução no ritmo de síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas da hemoglobina denominada de síndromes talassêmicas.

Neste estudo identificamos as alterações moleculares em 3 pacientes portadores de variante de cadeia  $\delta$ , 7 pacientes com variantes de cadeia  $\beta$  e 2 pacientes com talassemia  $\beta$ . A caracterização das alterações foi feita pelo sequenciamento de DNA dos genes de globina beta e delta após amplificação pela reação em cadeia da polimerase.

Variantes como as Hbs Lepore-Boston-Washington, Leiden, Korle-Bu e A<sub>2</sub>'B<sub>2</sub> representam os primeiros casos descritos na nossa população sendo que as Hbs Leiden e Korle-Bu foram demonstradas pela primeira vez por análise de DNA.

Uma nova variante de cadeia  $\beta$  eletroforeticamente silenciosa detectada pela eletroforese de cadeia de globinas, denominada de Hb Rio Claro  $\beta$ 34(B16)Val→Met, e encontrada em associação com Hb Hasharon ( $\alpha$ 47 Asp→His) e alfa talassemia-2 ( $-\alpha^{3.7}$ ). Foi descrita neste trabalho adicionalmente uma nova mutação de ponto afetando o codon 6 no gene da beta globina (GAG→TAG), criando um "stop codon" e uma alteração rara na nossa população na região promotora do gene da globina beta (-88), ambas levando a talassemia  $\beta$ .

REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS



Baglioni, C. (1962). The fusion of two peptide chains in hemoglobin Lepore and its interpretation as a genetic deletion. **Proc Natl Acad Sci USA** **48**:1880-1886.

Baglioni, C. (1965). Abnormal human hemoglobins X. A study of hemoglobin Lepore Boston. **Biochim Biophys Acta** **97**:37-46.

Ball, E.W., Meynell, M.J., Beale, D., Kynoch, P., Lehmann, H., Stretton, A.O.W. Haemoglobin A<sub>2</sub>' :  $\alpha_2\delta_2$  16 Glycine→Arginine. **Nature** **209**: 1217-1218.

Bank, A. (1978). The thalassemia syndromes. **Blood** **51**: 369-384.

Barnabas, J. & Muller, C.J. (1962). Haemoglobin Lepore Hollandia. **Nature** **194**:931-932.

Basset, P., Beuzard, Y., Garel, M.C. & Rosa, J. (1978). Isoelectric focusing of human hemoglobin: Its application to screening, to the characterization of 70 variants, and to the study of modified fractions of normal hemoglobins. **Blood** **51**: 971-982.

Baysal, E. & Carver, M.F.H. (1995). The  $\beta$  and  $\delta$ -thalassemia repository. **Hemoglobin** **19**: 213-236.

Betke, K., Marti, H.R., Schlicht, I. (1959). Estimation of small percentage of fetal hemoglobin. **Nature** **184**: 1877-1878.

Blouquit, Y., Braconnier, F., Cohen-Solal, M., Foldi, J., Arous, N., Ankri, A., Binet, J.L., Rosa, J. (1980). Hemoglobin Pitie-Salpetriere [ $\beta$ 34(B16)Val $\rightarrow$ Phe]. A new high oxygen affinity variant associated with familial erythrocytosis. **Biochem. Biophys. Acta** **624**: 478,.

Bunn, H.F. & Forget, B.G. (1986). **Hemoglobin: Molecular, genetic and clinical aspects**. Philadelphia, PA, Saunders.

Camachella, C., Serra, A., Bertero, M.T., Gottardi, E., Altarano, A., Revello, D., Travi, M., Seia, M., Cremonesi, L. & Ferrari, M. (1989). Molecular characterization of Italian chromosomes carrying the Lepore Boston gene. **Acta Haematol** **81**:136-139.

Codrington, J.F., Li, H-W., Kutlar, F., Gu, L-H., Ramachandran, M., Huisman, T.H.J. (1990). Observations on the Levels of Hb A<sub>2</sub> in patients with different  $\beta$ -thalassemia mutations and a  $\delta$  chain variant. **Blood** **76**: 1246-1249.

Costa, F.F., Tavella, M.H. & Zago, M.A. (1989). Deletion type  $\alpha$ -thalassemia among Brazilian patients with sickle cell anemia. **Rev. Brasil. Genet.** **12**: 605-611.

Curtain, C.C. (1964). **Austrl. J. Exper. Biol. Med. Sci.** **42**: 89.

Curuk, M.A., Kutlar, A. & Huisman, T.H.J. (1992). Hb S Helby [ $\alpha_2\beta_2$  131 (H9) Gln-Lys]  $\beta^0$  - thalassemia [codon 15 (TGG-TGA)] identified by DNA sequence. **Hemoglobin** **16**:417-419.

Dacie, J.V. & Lewis, S.M. (1984). **Practical Haematology**. 6<sup>o</sup> edição, Churchill, New York.

Debernardi, S., De Bellis, G., Mosca, A., Paleari, R., Luzzana, M. (1996). Characterization of Hb Camperdown [ $\beta$ 104(G6)Arg→Ser] by capillary electrophoresis and automated solid phase DNA sequencing. **Hemoglobin** **20**: 155-160.

De Jong, W.W.W., Went, L.N., Bernini, L.F. (1968). **Nature** **220**: 788,.

Dickerson, R.E. & Geis, I. (1983). **Hemoglobin: structure, function, evolution and pathology**. Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA.

Efremov, D.G., Rudovic, R., Niazi, G.A., Hunter Jr., E., Huisman, T.H.J. & Schroeder, W.A. (1976). An individual with hemoglobin-Lepore-Baltimore  $\delta$ - $\beta$  thalassemia in a Yugoslavian family. **Scand J Haematol** **16**:81-89.

Efremov, D.G., Efremov, G.D., Zisovski, N., Stojanovski, N., Kutlar, F., Diaz-Chico, J.C., Kutlar, A., Yang, K.G., Stoming, T.A., & Huisman, T.H.J. (1988). Variation in clinical severity among patients with Hb Lepore-Boston- $\beta$ -thalassaemia is related to the type of  $\beta$ -thalassaemia. **Brit J Haematol** **68**:351-355.

Elizondo, J., Saenz, G.F., Alvarado, M.A., Ramon, M. (1976). Hallazgo de la hemoglobina Korle Bu (alfa2-beta2 73 Asp-Asn) en Costa Rica. **Sangre** **21**: 54,.

Erlich, H.A.(1989). **PCR Technology-Principles and applications for DNA amplification**. Stockton Press. New York.

Fioretti, G., De Angioletti, M., Masciangelo, F., Lacerra, G., Scarallo, A., de Bonis, C., Pagano, L., Guarino, E., De Rosa, L., Salvati, F. & Carestia, C. (1992). Origin heterogeneity of Hb Lepore-Boston gene in Italy. **Am J Hum Genet** **50**:781-786.

Fischel-Ghodsian, N., Hirsch, P.C. & Bohlman, M.C. (1990) Rapid detection of hemoglobin C mutation by allelic-specific polymerase chain reaction. **Am J Hum Genet** **47**:1023-1024.

Flavell, R.A., Kooter, J.W. De Boer, E., Little, P.F.R. & Williamson, R. (1978). Analysis of  $\delta$ - $\beta$  globin gene in normal and Hb Lepore DNA: direct determination of gene linkage and intergene distance. **Cell** **15**:25-41.

Forget, B.G., Benz, E.J. & Weissman, S.M. (1983). Normal human globin gene structure and mutations causing the  $\beta$ -thalassemia syndromes. In: **Caskey CT, White RL (eds) Recombinant DNA applications to human disease**. Banbury Report 14, Cold Spring Harbor Laboratory.

Fritsch, E.F., Lawn, R.M. & Mamiatis, T. (1980). Molecular cloning and characterization of the human  $\beta$ -like globin gene cluster. **Cell** **19**: 959.

Galacteros, F., Kleman, K., Caburi-Martin, J., Beuzard, Y., Rosa, J. & Lubin, B. (1980). Cord blood screening for hemoglobin anormalities by thin layer isoelectric focusing. **Blood** **56**: 1068-1071.

Gerald, P.S. & Diamond, L.K. (1958). A new hereditary hemoglobinopathy (The Lepore trait) and its interaction with thalassemia trait. **Blood** **13**: 835-845.

Gill, F., Antwater, J. & Shwartz, E. (1972). Hemoglobin Lepore trait: globin synthesis in bone marrow and peripheral blood. **Science** **1978**: 623-625.

Gonçalez-Redondo, J.M., Stoming, T.A., Lancelos, K.D., Gu, Y.C., Kutlar, A., Kutlar, F., Nakatsuji, T., Deng, B., Han, I.S., Mckie, V.C., Huisman, T.H.J. (1988). **Blood** **72**: 1007,.

Gonçalez-Redondo, J.M., Kutlar, A., Kutlar, F., Mckie, V.C., Mckie, K.M., Baysal, E., Huisman, T.H.J. (1991). Molecular Characterization of Hb S(C)  $\beta$ -thalassemia in American blacks. **Am. J. Hematol.** **38**: 9-14.

Huisman, T.H.J. (1990). Frequencies of common  $\beta$ -thalassemia alleles among different populations: variability in clinical severity. **Brit. J. Haem.** **75**: 454-457.



Huisman, T.H.J. (1992). The  $\beta$  and  $\delta$ -thalassemia repository. **Hemoglobin 16:** 237-258.

Ibarra, B., Casas-Castaneda, M., Villalobos-Arambula, A.R., Zamudio, G., Perea, F.J., Rodriguez, J., Perez-Romano, B., Ruiz-Arguelles, G., Abarca-Salvatori, A., Huisman, T.H., Gu, L.G., Ruiz-Reyes, G. (1997). Hb Lepore Washington-Boston in two Mexican mestizo families. **Rev. Invest. Clin. 49:** 221-223.

IHIC(International Hemoglobin Information Center). (1993). Variants list. Variants of delta chain, **Hemoglobin 17:** 115.

Jones, R.T., Saiontz, H.I., Head, C., Shih, D.T., Fairbanks, V.F. (1990). Hb Johnstown [beta 109(G11)Val-Leu]: a new electrophoretically silent variant that causes erythrocytosis. **Hemoglobin 14:** 147-156.

Juricic, D., Rudzdic, I., Bee, Z., Efremov, G.D., Casey, R., Lehmann, H. (1983). Hemoglobin Leiden [beta6 or 7 (A3 or A4)Glu leads to 0] in a Yugoslavian woman arisen by a new mutation. **Hemoglobin 7:** 271-277.

Konotey-Ahulu, F.I.D., Gallo, E., Lehmann, H., Ringelmann, B. (1968). Haemoglobin Korle-Bu ( $\beta$ 73 aspartic acid - asparagine). **J. Med. Genet. 5:** 107,.

Labie, D., Schoroeder, W.A., Huisman, T.H.J. (1966). The amino acid sequence of the chains of hemoglobin Lepore Augusta-Lepore Washington. **Biochim Biophys Acta** 127:428-437.

Labie, D., Belkhodja, O., Coquelet, M.L., Elion, J., Wajcman, H. (1974). Un cas d'hémoglobine Korle Bu [ $\beta$ 73 (E17) Asp-Asn] en Côte-d'Ivoire. Arguments pour une diffusion du gène. Nouvel abord technique [A case of hemoglobin Korle Bu [ $\beta$ 73 (E17) Asp-Asn] in the Ivory Coast. Arguments for the diffusion of the gene]. New technical approach. **Nouv. Rev. Fr. Hematol.** 14: 601,.

Lanclos, K.D., Patterson, J., Efremov, G.D., Wong, S.C., Villegas, A., Ojwang, P.J., Wilson, J.B., Kutlar, F. & Huisman, T.H.J. (1987). Characterization of chromosomes with hybrid genes for Hb Lepore-Washington, Hb Lepore-Baltimore, Hb P-Nilotic, and Hb Kenya. **Hum Gen** 77:40-45.

Lehmann, H., Beale, D., Boi-Doku, F.S. (1964). Haemoglobin G-Accra. **Nature** 203: 363,.

Liang, R., Liang, S., Jiang, N.H., Wen, X-J, Zhao, I-B, Nechtman, J.F., Stoming, T.A., Huisman, T.H.J. (1994). Alfa e beta thalassemia among chinese children in Guangxi province, P.R. China: molecular and haematological characterization. **Brit. J. Haem.** 86:351-354.

- Li, H-W., Codrington, J.F., Schiliro, G., Wadsworth, L.D., Beris, Ph., Adekile, A., Huisman, T.H.J. (1991). The usefulness of sequence analysis of amplified DNA for the identification of  $\delta$  chain variants. **Hemoglobin 15(1&2): 77-84.**
- Lie-Injo, L.E., Ganesan, J., Randhawa, Z.I., Peterson, D., Kane, J.P. (1977). Hb Leiden-beta (0) thalassemia in a Chinese with severe hemolytic anemia. **Am. J. Hematol. 2: 335-342.**
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Laver, J. & Lawn, R.M. (1980). The molecular genetics of human hemoglobin. **Ann. Rev. Genet. 14: 145-178.**
- Marengo-Rowe, A.J. (1965). Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. **J. Clin. Pathol. 18: 790-792.**
- Marinucci, M., Mavilio F., Massa, A., Gabbianelli, M., Fontanarosa, P.P., Samoggia, P. S Tentori, L. ( 1979 ). Hemoglobin Lepore trait: heamatological and studies on the Italian population **Br J Haematol 42: 557 - 565**
- Martins, C.S.B., Ramalho, A.S., Sonati, M.S. & Costa, F.F. Molecular characterization of beta thalassemia heterozygotes in Brazil. **Journal of Medical Genetics, 30:797-800,1993. (1993).**
- Masala B., Manca, L., Wilson, J. B., Webber B.B, Kutlar, A . S Hisman, T.H.J. (1990) Hb Lepore - Baltimore in a North Sardinian Family. **Hemoglobin 14: 241 - 246**

- Mavilio, F., Giampaolo, A., Caré, A., Sposi, N.M S Marinucci, M. (1983). The crossover region in Lepore Boston hemoglobinopathy is restricted to a 59 base pairs region around the 5 splice junction of the large globin gene intervening ssequence. **Bood 62**: 230 - 233.
- McDonald, M.J., Noble, R.W., Sharma, V.S., Ranney, H.M., Crookston, J.H., Schwartz, J.M. (1975). **J. Mol. Biol. 94**: 305.
- Metzenberg, A.B., Wurzer, G., Huisman, T.H.J., Smithies, O. (1991). Homology requirements for unequal crossing over in humans. **Genetics 128**: 143-161.
- Miranda, S.R.P., Kimura, E.M., Teixeira, R.C., Bertuzzo, C.S., Ramalho, A.S., Saad, S.T.O., Costa, F.F. (1996). Hb Camperdown [ $\alpha_2\beta_2$  104(G6)Arg→Ser] identified by DNA analysis in a brazilian family. **Hemoglobin 20**: 147-153.
- Moo-Penn, W.F., Jue, D.L., Johnson, M.H., Bechtel, K.C. & Patchen, L.C. (1980). Hemoglobin variants and methods used for their characterization during 7 years of screening at the Center for Disease Control. **Hemoglobin 4**: 347-351.
- Mullis, K.B. & Floona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed reaction. **Methods Enzymol. 155**: 335-345.

- Nagel, R.L., Rieder, R.F., Bookchin, R.M., Watson, J.G. (1973). Some functional properties of hemoglobin Leiden. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** **53**: 1240-1245.
- Nagel, R.L., Lin, M.J., Witkowska, H.E., Fabry, M.E., Bestak, M., Hirsch, R.E. (1993). Compound heterozygosity for hemoglobin and Korle-Bu: Moderate microcytic hemolytic anemia and acceleration of crystal formation. **Blood** **82**: 1907-1912.
- Nakatsuji, T., Miwa, S., Ohba, Y., Hattori, Y., Miyaji, T., Hino, S., Matsumoto, N. (1981). A new unstable hemoglobin, Hb Yokohama beta 31 (B13) Leu substituting for Pro, causing hemolytic anemia. **Hemoglobin** **5**: 667-678.
- Novelletto, A., Hafez, M., Deidda, G., Di Renzo, A., Felecetti, L., El-tahan, H., Morsi, Z.E., El Ziney, M., Al-Tonbary, Y., Sittien, A. & Terrenato, L. (1990). Molecular characterization of  $\beta$ -thalassemia mutations in Egypt. **Hum. Genet.** **85**: 272-274.
- Orkin, S.H., Antonarakis, S.E., Kazazian, H.H. (1984). **J. Biol. Chem.** **259**: 8679,.
- Orkin, S.H. & Kazazian, H.H.J. (1984). The mutation and polymorphism of the human  $\beta$ -globin gene and its surrounding DNA. **Ann. Rev. Genet.** **18**: 131-171.



- Ostertag, W. & Smith, E.W. (1969). Hemoglobin Lepore Baltimore: a third type of crossing over. *Eur J Biochem* 10:371-376.
- Pagano, L., Carbone, V., Fioretti, G., Viola, A., Buffardi, S., Rametta, V., Desicato, S., Pucci, P., De Rosa, C. (1997). Compound heterozygosity for Hb Lepore-Boston and Hb Neapolis (Dhonduri) [ $\beta$ 126(H4)Val-Gly] in a patient from Naples, Italy. **Hemoglobin** 21: 1-15.
- Pauling, L., Itano, H., Singer, S.J. & Wells, I.C. (1949). Sickle cell anemia: A molecular disease. **Science** 110: 543-548.
- Pearson, H.A. & Moore, M.M. (1965). Structural characterization of Hb A<sub>2</sub>' (B2):  $\alpha_2\delta_2$  16 Arg. **Am. J. Hum. Genet.** 17: 125,.
- Perlman, M.M., Wiltshire, B.G., Stevens, K., Cassel, R., Lehmann, H. (1981). Haemoglobin Leiden in a South African negro. A case report. **S. Afr. Med. J.** 59: 537-540.
- Perutz, M.F. (1987). Molecular anatomy, physiology and pathology of hemoglobin. In: Stamatoyannopoulos, G., Nienhuis, A.W., Leder, P. & Majerus, P.W. (ed.) **The molecular basis of blood diseases**. WB Saunders, Philadelphia.
- Ponez, M., Solowiejiszuk, D., Harpel, B., Mory, Y., Schwartz, E. & Surrey, S. (1982). Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood. Analysis of  $\beta$ -like globin genes. **Hemoglobin** 6: 27-36.

- Praxedes, H. & Lehmann, H. (1972). **Abstract 400**, Proceedings of the 14th International Congress of Hematology, São Paulo, Brazil.
- Rahbar, S., Lee, T. & Asmeron, Y. (1991). Hb Beckman  $\alpha_2\beta_2$  135 (H13) Ala-Glu: a new unstable variant and reduced oxygen affinity. **Blood** **78** (suppl 1): 204a.
- Ramalho, A.S. (1976). Investigação genético epidemiológica das talassemias beta e delta-beta no estado de S.P. **Rev. Paul. Med.** **88**: 68.
- Ramalho, A.S., Magna, L.A., Costa, F.F. & Grotto, H.Z. (1985). Talassemia menor: um problema de saúde pública no Brazil? **Rev. Bras. Genet.** **VIII 4**: 747-754.
- Ribeiro, M.L., Cunha, E., Gonçalves, P., Martins, N.G., Fernandez, G.M.A., Tamagnini, G.P., Smetanina, N.S., Gu, L.H., Huisman, T.H. (1997). Hb Lepore-Baltimore (delta 68 Leu-beta 84Thr) and Hb Lepore-Washington-Boston (delta 87Gln-beta IVS-II-8) in central Portugal and Spanish alta extremadura. **Hum. Genet.** **99**: 669-673.
- Romana, M., Keclard, L., Guillemin, G., Lavocat, E., Saint-Martin, C., Berchel, C., Méréault, G. (1996). Molecular characterization of  $\beta$ -thalassemia mutations in Guadeloupe. **Am. J. Hematol.** **53**: 228-233.

- Romana, M., Diara, J.P., Merghoub, T., Keclard, L., Saint-Martin, C., Berchel, C., M  rault, G. (1997). Hemoglobin Sickle-Lepore: an unusual case of sickle cell disease. **Acta Haematol.** **98**: 170-171.
- Saiki, R.K., Geelfond, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** **239**: 487-491.
- Salzano F.M. & Tondo C.V. (1982). Hemoglobin types in Brazilian populations. **Hemoglobin** **6(1)**: 85-97
- Schneider, R.G. & Barwick, R.C. (1982). Hemoglobin mobility in citrate agar electrophoresis - its relationship to anion binding. **Hemoglobin** **6**: 199-203.
- Schroeder, W.A., Huisman, T.H.J., Shelton, J.R., Shelton, J.B., Kleihaver, E.F., Dozy, A.M. & Robberson, B. (1968). Evidence for multiple structural genes for the  $\gamma$  chain of human fetal hemoglobin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **60**: 537-544.
- Schroeder, W.A., Powars, D., Shelton, J.B., Shelton, J.R., Wilson, J.B., Huisman, T.H.J., Bedros, A.A. (1982). An unusual phenotypic expression of Hb Leiden. **Biochem. Genet.** **20**: 1175-1187.
- Sick, K., Beale, D., Irvine, D., Lehmann, H., Goodall, P.T. & MacDougall, S. (1967). Hemoglobin G Copenhagen and haemoglobin J Cambridge. Two new  $\beta$  chain variants of hemoglobin A. **Biochim Biophys Acta** **140**:231-237.

- Sonati, M.F. Talassemia  $\alpha$  com deficiência gênica em uma população negróide brasileira. (1990). **Tese de Doutorado**.
- Sonati, M.F., Kimura, E.M., Grotto, H.Z.W., Gervasio, S.A., Costa, F.F. (1996). Hereditary hemoglobinopathies in a population from southeast Brazil. **Hemoglobin 20(2): 175-179**.
- Strahler, J.R., Rosenbloom, B.B. & Hanash, S.M. (1983). A silent neutral substitution detected by reverse phase high performance liquid chromatography: Hemoglobin Beirut. **Science 221: 860-862**.
- Tilghman, S.M., Tiemeier, D.C., Seidman, J.G., Peterlin, B.M., Sullivan, M., Marzel, J.V. & Leder, P. (1978). Intervening sequences of DNA identified in the structural portion of the mouse  $\beta$ -globin gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 725-728**.
- Tondo, C.V., Salzano, F.M., Rucknagel, D.L. (1963). **Am. J. Hum. Genet. 15: 265**.
- Yamashiro, Y., Okayama, N., Sakata, S., Shigedomi, Y., Kawano, E., Hattori, Y., Ohba, Y. (1997). [First example of Hb Lepore Washington-Boston trait in a Japanese]. **Rinsho Byori 45: 1151-1155**.
- Zago, M.A., Costa, F.F. & Botura, C. (1981). Beta-thalassemia in Brazil. **Rev. Pesq. Med. Biol. 14: 383**.

Zago, M.A. & Costa, F.F. (1985). Hereditary haemoglobin disorders in Brazil. **Trans Royal Soc. Trop. Med. Hyg.** **79**: 385-388.

Zhao, W., Wilson, J.B., Huisman, T.H.J., Sciarratta, G.V., Ivaldi, G., Petrini, C., Ripamonti, M. (1990). Hb Camperdown or  $\alpha_2\beta_2$  104(G6)Arg→Ser in two italian males. **Hemoglobin** **14**: 459-461.

Wajcman, H., Vasseur, C., Blouquit, Y. & Galacteros, F. (1991a). Hb Zaire and Hb Duino: two new human hemoglobin variants due rare mutational events. **Blood** **78** (suppl1):205a.

Wajcman, H., Kister, J., Vasseur, C., Blouquit, Y., Behnken, J.L. & Galacteros, F. (1991b). Hb Ingelheim [ $\beta$ 99(G1)Asp-Glu]: a new high affinity hemoglobin variant destabilizing the  $\alpha 1\beta 2$  interface. **Blood** **78**(suppl1):206a.

Waye, J.S., Patterson, M., Eng, B., Scully, M-F. (1994).  $\beta$ -thalassemia intermedia in a lebanese child due to homozygosity for the -88 (C→T) mutation. **Hemoglobin** **18**: 383-388.

Waye, J.S., Eng, B., Patterson, M., Chui, D.H.K., Fernandes, B.J. (1997). Novel  $\beta^0$ -thalassemia mutation in a Canadian woman of British descent (codons 72/73, -AGTGA, +T). **Hemoglobin** **21**: 385-387.

Weatherall, D.J. & Clegg, J.B. (1981). **The thalassemia syndromes**. 3ª edição, Oxford: Blackwell Scientific Publications.

- Wilkinson, T., Chua, C.G., Carrell, R.W., Robin, H., Exner, T., Lee, K.M., Kronenberg, H. (1975). Haemoglobin Camperdown  $\beta$  104(G6) Arginine-Serine. **Biochim Biophys Acta** **393**: 195-200.
- William, J.W., Beutler, E., Ersleu, A.J. & Lichtman, M.A. (1990). **Hematology**. 4<sup>a</sup> edição. McGraw Hill Pub. Company, New York.
- Winter, W.P. & Yodh, J. (1983). Interaction of human hemoglobin and variants with agar. **Science** **221**: 175-178.