

MÁRCIA REGINA DE SOUZA COSSA WENNING

**IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES ESTRUTURAIS E
TALASSÊMICAS NOS GENES DA GLOBINA ALFA**

CAMPINAS

2000

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentado ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área Ciências Biomédicas da aluna **Márcia Regina de Souza Cossa Wenning**.

Campinas, 11 de fevereiro de 2000

Prof. Dra. Maria de Fátima Sonati
Orientadora



MÁRCIA REGINA DE SOUZA COSSA WENNING

***IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES ESTRUTURAIS E
TALASSÊMICAS NOS GENES DA GLOBINA ALFA***

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

Orientadora: Profª Drª Maria de Fátima Sonati

CAMPINAS

2000

2006442

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

W487i

Wenning, Márcia Regina de Souza Cossa

Identificação de mutações estruturais e talassêmicas nos genes da globina alfa / Márcia Regina de Souza Cossa Wenning. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

Orientador : Maria de Fátima Sonati

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

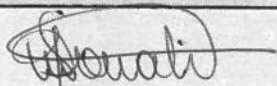
1. Hemoglobinopatia. 2. Talassemia. 3. Sangue doenças. I. Maria de Fátima Sonati. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

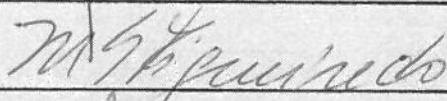
Orientador: Profa. Dra. Maria de Fatima Sonati

Membros:

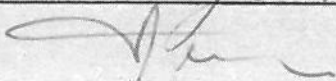
1.



2.



3.



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

Data:

DEDICATÓRIA

*A meus pais Eurydice e Helena,
a quem muito devo,
a meus irmãos
Flávio, Heloisa e Alexandre
a meu esposo Carlos
e a meu filho Eduardo,
um estímulo para que eu prossiga.*

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Maria de Fátima Sonati, pelo constante apoio, incentivo e dedicação na orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, pelas precisas observações, sugestões e correções dos manuscritos.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela cuidadosa revisão de idioma do manuscrito " α -Globin Genes: Thalassemic and Structural Alterations in a Brazilian Population".

Aos Professores do Departamento de Patologia Clínica, que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação acadêmica.

Às Professoras Lúcia Bragazza, Sheila Nakamura, Neusa Osti, Sílvia Cazenave, Maria de Fátima Coelho, Tatiana Lavinias e Magali R. Soares, às funcionárias Voísa Marçal, e em especial, à Dulcinéia Williams, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do CCF da PUC-Campinas, pela grande colaboração e incentivo.

À Elza Kimura, Sirley Gervásio, Patrícia Gonzalez e Simone B. Jorge, pelo precioso auxílio prestado durante a execução deste trabalho.

À Nádia M. Silva, pelo grande apoio e amizade.

Aos amigos do Laboratório, Denise, Daniela, Eliane, Simone Sant'Ana, Dorival, Gisele, Fernando e Cinira, pela amizade e colaboração.

À Diretoria de Apoio Didático, Científico e Computacional da Faculdade de Ciências Médicas, particularmente aos funcionários Mário, Mercedes e Péricles, pela competência e dedicação na preparação da documentação científica.

À FAPESP (auxílios 96/1118-8 e 97/11725-1) e ao CNPq (auxílio 520059/95-6) pelo suporte financeiro destinado à execução deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para sua realização.

	PÁG.
RESUMO	<i>i</i>
ABSTRACT	<i>iii</i>
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Estrutura e função das hemoglobinas humanas.....	2
1.2. Os genes de globinas.....	4
1.3. As hemoglobinopatias.....	5
1.4. A talassemia α – fisiopatologia.....	7
1.4.1. Estrutura e evolução dos genes da globina α	8
1.4.2. As bases moleculares da talassemia α	10
1.4.3. Talassemia α não-delecional.....	15
1.4.4. Diferentes formas clínicas.....	20
1.4.5. Distribuição mundial da talassemia α	25
1.4.6. A talassemia α no Brasil.....	26
Capítulo 1: α-Globin Genes: Thalassemic and strutural alterations in a Brazilian Population	29
Capítulo 2: Molecular characterization of hemoglobins Kurosaki ($\alpha 7$ Lys$\rightarrow$Glu), G-Pest ($\alpha 74$ Asp$\rightarrow$Asn), Stanleyville-II ($\alpha 78$ Asn$\rightarrow$Lys) and J-Rovigo ($\alpha 53$ Ala$\rightarrow$Asp).....	43
Capítulo 3: Hb Campinas [$\alpha 26(B7)$ Ala$\rightarrow$Val]]: A novel electrophoretically silent variant.....	48

Capítulo 4: Hb Rio Claro [β 34(B16) Val→Met]: A novel electroforetically silent variant found in association with Hb Hasharon [α 47(CE5) Asp→His] and α Thalassemia-2 ($-\alpha^{3.7}$).....	56
2. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS	63
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1: Representação esquemática da molécula de Hemoglobina; letras de A à H indicam os domínios helicais das cadeias α e β (adaptada de Dickerson & Gueiss, 1983).....	3
Figura 2: Síntese das cadeias globínicas na vida pré e pós natal (adaptado de Weatherall & Clegg, 1981).....	3
Figura 3: Organização dos agrupamentos dos genes de globinas nos cromossomos 16 e 11 (adaptado de Giordano, 1998 – Tese de Doutorado).....	5
Figura 4: Agrupamento α (braço curto do cromossomo 16) (adaptado de Liebhaber, 1989).....	8
Figura 5: Genes da globina α - Estrutura (adaptado de Embury, 1988).....	8
Figura 6: Os subsegmentos homólogos, X, Y, Z, contendo os genes α (Embury, 1988).....	9
Figura 7: Cromossomos desalinhados, originando os haplótipos $-\alpha^{4.2}$ e $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti-4.2}}$, $-\alpha^{3.7}$ e $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti-3.7}}$ (Embury, 1988).....	12
Figura 8: Localização das deleções - $\alpha^{3.7}$ e $\alpha^{4.2}$ no <i>cluster</i> α e sítio da enzima Apa I, definindo a região exata do <i>crossing over</i> no segmento Z (adaptado de Dodé <i>et al</i> , 1993 e Baysal & Huisman, 1994).....	12
Figura 9: Principais deleções que causam talassemia α a: deleções que removem um dos genes α do genoma haplóide, causando talassemia α^+ b: remoção ou inativação dos dois genes α , causando talassemia α^0 (adaptado de Giordano, 1998 – Tese de Doutorado)...	14

Figura 10: **A:** esfregaço de sangue periférico na doença da Hb H mostrando moderadas microcitose, hipocromia, poiquilocitose e células em alvo. **B:** esfregaço de sangue periférico na doença da Hb H corado com azul brilhante de cresil, mostrando os corpos de inclusão (adaptado de Hoffbrand & Pettit, 1995)..... 21

Figura 11: **A:** esfregaço de sangue periférico da tal α^0 homozigótica mostrando acentuadas hipocromia, policromasia e eritroblastos circulantes. **B:** representação esquemática dos genótipos da Talassemia α (adaptado de Hoffbrand & Pettit, 1995)..... 24

Figura 12: **a:** distribuição mundial da Talassemia α e hemoglobinopatias importadas **b:** distribuição geográfica da malária (adaptado de Hartevelt, tese PhD, 1997)..... 28

LISTA DE QUADROS

	PÁG.
Quadro 1: Formas não delecionais de talassemia α	18
Quadro 2: Genótipos x aspectos clínicos e laboratoriais da talassemia α	23

RESUMO

Para identificar as mutações presentes nos genes da globina α da população do Sudeste Brasileiro, foram estudados 7 pacientes com Doença da Hb H e 27 indivíduos com alterações estruturais de cadeia α . A metodologia envolveu a reação em cadeia pela polimerase (PCR), a análise com enzimas de restrição e o sequenciamento direto de DNA. Os pacientes com Hb H, caucasóides, revelaram os seguintes genótipos: $-(\alpha)^{20.5}/-\alpha^{3.7}$ (2 casos), $--^{MED}/-\alpha^{3.7}$ (1 caso), $--^{MED}/\alpha^{Hph}\alpha$ (1 caso) e a interação da deleção $-\alpha^{3.7}$ com uma forma incomum de talassemia α , não-delecional $[-\alpha^{3.7}/(\alpha\alpha)^T]$ (3 casos). Entre as alterações estruturais encontradas estão as Hbs Hasharon ($\alpha 47\text{Asp}\rightarrow\text{His}$) (15 caucasóides), J-Rovigo ($\alpha 53\text{Ala}\rightarrow\text{Asp}$) (4 caucasóides), Stanleyville-II ($\alpha 78\text{Asn}\rightarrow\text{Lis}$) (3 negróides e 1 caucasóide), G-Pest ($\alpha 74\text{Asp}\rightarrow\text{Asn}$) (1 negróide), Kurosaki ($\alpha 7\text{Lis}\rightarrow\text{Glu}$) (1 caucasóide), Westmead ($\alpha 122\text{His}\rightarrow\text{Gln}$) (1 caucasóide) e Campinas ($\alpha 26\text{Ala}\rightarrow\text{Val}$) (1 caucasóide), uma variante não descrita previamente. As Hbs Hasharon e Stanleyville-II foram encontradas em associação com a deleção $-\alpha^{3.7}$. Foram determinadas pela primeira vez as bases moleculares das Hbs J-Rovigo, Stanleyville-II, G-Pest e Kurosaki ($\text{GCC}\rightarrow\text{GAC}$, $\text{AAC}\rightarrow\text{AAA}$, $\text{GAC}\rightarrow\text{AAC}$, $\text{AAG}\rightarrow\text{GAG}$, respectivamente). Embora as hemoglobinopatias sejam frequentes, pouco se sabe sobre as alterações dos genes α que acometem a população brasileira. As mutações aqui detectadas refletem a importante contribuição italiana e africana na população desta região do Brasil e indicam a presença de formas não-delecionais de talassemia α , bem como de variantes estruturais raras.

ABSTRACT

In order to identify the α -globin gene mutations present in the population of southeastern Brazil, 7 unrelated Hb H disease patients and 27 individuals with α -chain structural alterations were studied. Methodology involved PCR, restriction enzyme analyses and DNA direct sequencing. Among the Hb H patients, all Caucasians, 2 showed the $(\alpha)^{20.5}/-\alpha^{3.7}$ genotype, 1 the $-\text{MED}/-\alpha^{3.7}$, 1 the $-\text{MED}/\alpha^{\text{Hph}}\alpha$, and 3 the interaction of the $-\alpha^{3.7}$ deletion with an unusual α -thalassemia, non-deletional $[-\alpha^{3.7}/(\alpha\alpha)^T]$. The structural alterations were the Hbs Hasharon ($\alpha 47\text{Asp}\rightarrow\text{His}$) (15 Caucasians), J-Rovigo ($\alpha 53\text{Ala}\rightarrow\text{Asp}$) (4 Caucasians), Stanleyville-II ($\alpha 78\text{Asn}\rightarrow\text{Lys}$) (3 Blacks and 1 Caucasian), G-Pest ($\alpha 74\text{Asp}\rightarrow\text{Asn}$) (1 Black), Kurosaki ($\alpha 7\text{Lys}\rightarrow\text{Glu}$) (1 Caucasian), Westmead ($\alpha 122\text{His}\rightarrow\text{Gln}$) (1 Caucasian) and Campinas ($\alpha 26\text{Ala}\rightarrow\text{Val}$) (1 Caucasian), a variant not previously described. The Hbs Hasharon and Stanleyville-II were found in association with the $-\alpha^{3.7}$ deletion. The molecular bases of Hbs J-Rovigo, Stanleyville-II, G-Pest and Kurosaki were determined ($\text{GCC}\rightarrow\text{GAC}$, $\text{AAC}\rightarrow\text{AAA}$, $\text{GAC}\rightarrow\text{AAC}$, $\text{AAG}\rightarrow\text{GAG}$, respectively). Although hemoglobinopathies are frequent in Brazil, very little is known about the α -globin gene alterations. The deletions and the most prevalent structural alterations found here reflect the Italian and African contribution to the population of this region of Brazil and indicate the presence of non-deletional α -thalassemia, as well as rare variants.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS HEMOGLOBINAS HUMANAS

As hemoglobinas (Hb) humanas são tetrâmeros formados pela interação de duas cadeias polipeptídicas do "tipo alfa" [alfa (α ou zeta (ζ))] com duas cadeias do "tipo beta" [beta (β) delta (δ) gama (γ) ou épsilon (ϵ)], sendo cada uma delas ligada a um grupo prostético heme, resultante da combinação de um átomo de ferro com uma molécula de protoporfirina (Fig. 1). Essa conformação da molécula permite a sua ligação com o oxigênio (O_2), de forma reversível, efetuando assim o transporte do mesmo dos pulmões aos tecidos e de uma fração de gás carbônico (CO_2) dos tecidos aos pulmões (Bunn & Forget, 1986). Durante o desenvolvimento intra-uterino, diferentes hemoglobinas são responsáveis por esta função. Na fase embrionária, da 3ª à 8ª semana gestacional, ocorre a produção das Hbs Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower II ($\zeta_2\epsilon_2$), Portland I ($\zeta_2\gamma_2$) e Portland II ($\zeta_2\beta_2$). Por volta da 5ª semana, as cadeias ζ e ϵ são totalmente substituídas pelas globinas α e γ respectivamente, predominando durante todo o período fetal a Hemoglobina Fetal, Hb F ($\alpha_2\gamma_2$). A Hb F constitui cerca de 70% do total da hemoglobina do recém nascido (Stamatoyannopoulos *et al.*, 1994). Por volta do nascimento, as cadeias γ passam a ser substituídas pelas cadeias β , e a hemácia humana normal passa, gradativamente, a ser constituída pelas Hbs A ($\alpha_2\beta_2$ majoritária, e A₂ ($\alpha_2\delta_2$). Aos 6 meses de vida pós natal, o indivíduo, considerado adulto, tem cerca de 95% de Hb A, 2-3% de Hb A₂, e no máximo 2% de Hb F (Bunn & Forget, 1986). (Fig 2).

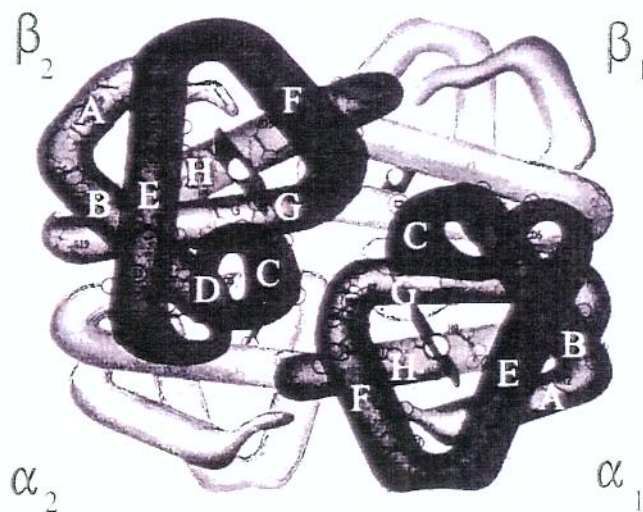


Figura 1: Representação esquemática da molécula de Hemoglobina Letras de A à H indicam os domínios helicais das cadeias α e β (adaptada de Dickerson & Gueiss, 1983)

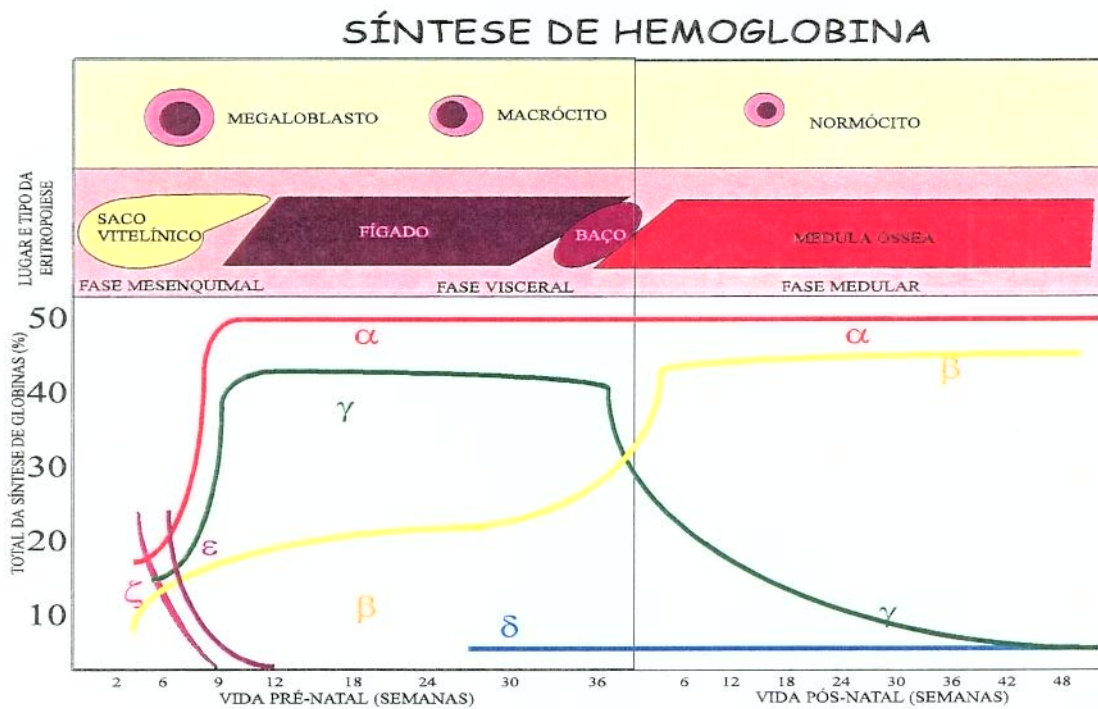


Figura 2: Síntese das cadeias globínicas na vida pré e pós natal (adaptado de Weatherall & Clegg, 1981)

1.2. OS GENES DE GLOBINAS

Os genes que codificam as cadeias globínicas estão localizados em dois complexos gênicos denominados *clusters*. O *cluster* α , responsável pela produção das cadeias α e ζ está localizado no braço curto do cromossomo 16 (16p 13.3) (Lauer *et al*, 1980), enquanto o *cluster* β , que comanda a síntese das cadeias β, δ, γ e ϵ , está localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p 15.5) (Fritsch *et al*, 1980; Rochette *et al*, 1994). O gene α é duplicado, α_2 e α_1 , assim como o γ , γ^A e γ^G , conforme a presença de alanina ou glicina na posição 136 da cadeia globínica. Os genes estão alinhados ao longo dos cromossomos na mesma ordem em que são ativados e transcritos durante o desenvolvimento (Lauer *et al*, 1980; Higgs *et al*, 1989) (Fig. 3).

Para que as hemácias se desenvolvam e desempenhem suas funções normalmente, é necessário que a síntese das cadeias do tipo α e β ocorra de forma balanceada, equilibrada. Embora no reticulócito normal a quantidade total de RNA mensageiro (mRNA) das globinas α exceda a quantidade de mRNA das globinas β (Chami *et al*, 1994; Smetanina *et al*, 1996), a tradução do mRNA da cadeia β parece ocorrer de forma mais rápida, evitando assim o desequilíbrio de síntese (Shakin & Liebhaber, 1986).

Todos os genes de globinas são compactos (de 1 a 2 kb), formados por três seqüências codificantes, os *exons*, interrompidas por duas regiões não codificantes, os *introns* ou "IVS" (*intervening sequence*) (Proudfoot & Maniatis, 1980).

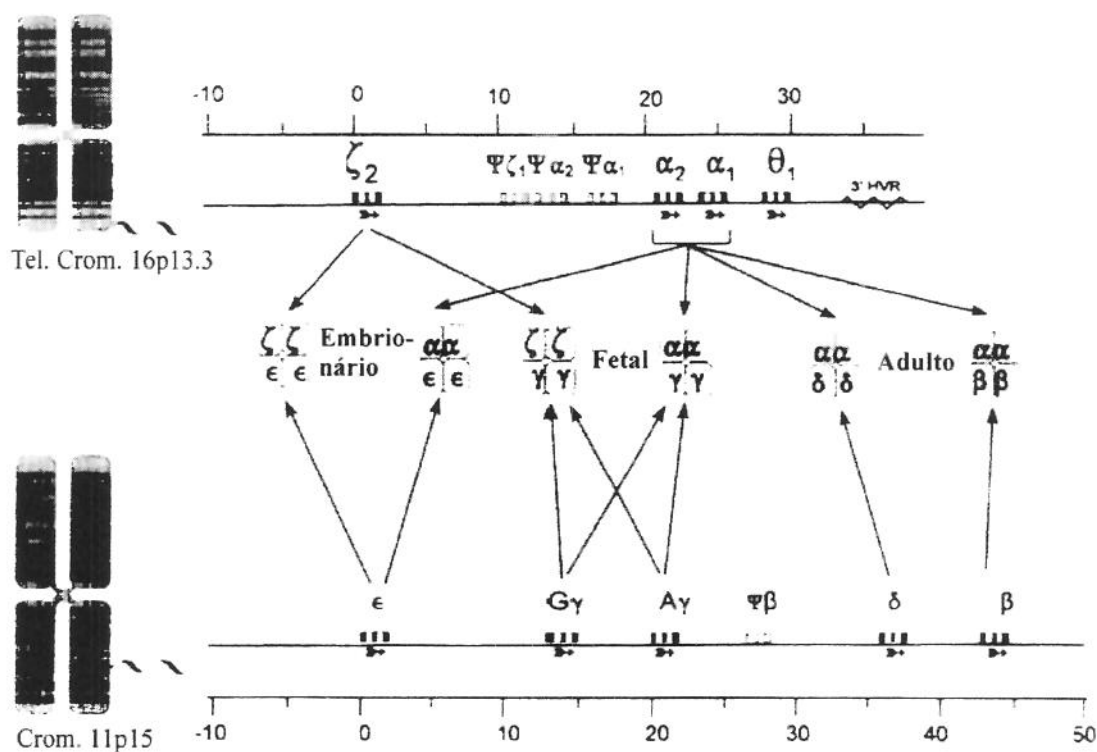


Figura 3: Organização dos agrupamentos dos genes de globinas nos cromossomos 16 e 11(adaptado de Giordano, 1998 – Tese de Doutorado)

1.3. AS HEMOGLOBINOPATIAS

As hemoglobinopatias (Hbpatias) constituem um grupo heterogêneo de doenças genéticas causadas por mutações que afetam os genes responsáveis pela síntese das cadeias globínicas (Weatherall & Clegg, 1981). Genericamente, podem ser classificadas em: ① alterações estruturais, onde ocorre a presença de hemoglobinas estruturalmente anômalas no interior das hemácias, ② alterações no ritmo de síntese (talassemias), com a supressão parcial ou total da produção de uma ou mais cadeias polipeptídicas, ou ainda, ③ em uma anomalia caracterizada pela produção persistente de cadeias γ durante a vida adulta, denominada Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal - PHHF (Bunn & Forget, 1986; Rochette *et al*, 1994)

Entre as Hbpatias estruturais, as mais importantes são a Hb S ($\alpha_2\beta_2$ Glu→Val) e a Hb C ($\alpha_2\beta_2$ Glu→Lis). A primeira foi descrita por Pauling e colaboradores, em 1949 (Pauling *et al*, 1949), demonstrada através de eletroforese de hemoglobina obtida de pacientes com anemia falciforme. Posteriormente, com o aperfeiçoamento das técnicas eletroforéticas, foram descritas as hemoglobinas C, D e E. Atualmente, há cerca de 750 variantes estruturais descritas (Huisman *et al*, 1998). Entretanto, apenas algumas estão associadas com manifestações clínicas e alterações hematológicas importantes. Estas podem resultar de alterações na solubilidade da hemoglobina, na estabilidade estrutural da molécula e na afinidade pelo oxigênio. São distúrbios que vão causar redução na sobrevida média das hemácias em circulação, levando a um quadro clínico de anemia hemolítica de grau variável (Moo-Penn *et al*, 1980; Bunn & Forget, 1986). A maioria das hemoglobinopatias estruturais é detectada por seu comportamento eletroforético anômalo em pH alcalino, já que a substituição de aminoácidos geralmente leva à mudança da carga elétrica da proteína. No entanto, em algumas variantes, a substituição por aminoácidos de mesma carga leva à uma migração eletroforética semelhante à da Hb A: são as variantes silenciosas (Moo-Penn *et al*, 1980). Neste caso, se faz necessário o uso de técnicas complementares de diferenciação, tais como a eletroforese em pH ácido, a focalização isoeletrica (Dacie & Lewis, 1995) e a eletroforese de cadeias globínicas (Alter *et al*, 1980).

As talassemias são alterações hereditárias, de distribuição mundial, causadas por mutações que afetam a síntese de uma ou mais cadeias globínicas (Bunn & Forget, 1986). A diminuição ou ausência total de uma das cadeias leva ao acúmulo da outra cadeia cuja síntese está preservada, que se tetrameriza e precipita no interior das hemácias, causando a lise precoce das células. Além disso, a hemoglobinizacão deficiente das hemácias resulta em microcitose e hipocromia, anormalidades morfológicas características deste grupo de doenças (Bunn & Forget, 1986; Williams *et al*, 1990). As talassemias são classificadas, conforme o tipo de cadeia cuja síntese está prejudicada, em talassemia α , β , γ , $\delta\beta$, $\delta\beta\gamma$.

A PHHF constitui um grupo heterogêneo de doenças genéticas caracterizadas pelo aumento dos níveis de Hb F no indivíduo adulto. O distúrbio pode genericamente ser classificado em: ① PHHF pancelular, na qual todas as hemácias dos afetados apresentam aumento nos níveis de Hb F, e ② PHHF heterocelular, onde apenas uma subpopulação de

células apresenta aumento na produção da Hb (células F) (Bunn & Forget, 1986). Há duas categorias de mutação que aumentam a produção de Hb F, demonstradas por análise molecular: são deleções envolvendo a porção 3' do *cluster* β , removendo os genes γ e β , e formas não delecionais, causadas por mutações de ponto nas regiões promotoras dos genes γ (Rochette *et al*, 1994).

1.4. A TALASSEMIA α - FISIOPATOLOGIA

Como descrito anteriormente, os genes da globina α são duplicados, α_2 e α_1 , perfazendo um total de 4 em cada célula diplóide normal. A talassemia α é um distúrbio hereditário de distribuição mundial, causada por mutações que afetam os genes α , levando à redução ou ausência da produção das cadeias da hemoglobina. Por um lado, há o comprometimento do processo de hemoglobinizacão, determinando eritrócitos hipocrômicos e microcíticos. Por outro, há a formação de Hbs anômalas constituídas pelos tetrâmeros das cadeias cuja síntese está normal. Assim, no período fetal, o excesso de cadeias γ resulta na formação da Hb Bart's (γ_4), uma Hb com elevada afinidade pelo oxigênio (Bunn & Forget, 1986). Após o nascimento, com a substituição das cadeias γ pelas cadeias β , o tetrâmero de cadeias β correspondente leva à formação da Hb H (β_4) que, além da elevada afinidade pelo O_2 , é altamente instável e se precipita com o envelhecimento das hemácias, formando corpos de inclusão. Estes lesam a membrana celular, determinando a remoção precoce destas células por um mecanismo macrofágico esplênico (Bunn & Forget, 1986; Williams *et al*, 1990). Os corpos de inclusão de Hb H podem ser visualizados por microscopia comum após incubação das hemácias, à 37° C, com azul brilhante de cresil (Dacie & Lewis, 1995). As Hbs Bart's e H, mais rápidas que a Hb A em pH alcalino, podem ser separadas por eletroforese em tampão Fosfato, em pH 6,5 - 7,0, pois nessa faixa de pH todas as demais Hbs encontram-se em seu ponto isoelétrico.

1.4.1. Estrutura e evolução dos genes da globina α

O *cluster* α compreende um segmento de DNA de aproximadamente 30 kb de comprimento e inclui o gene embrionário ζ três genes não funcionais (os pseudogenes ζ , α_2 e α_1) os genes α_2 e α_1 (separados por 4 Kb de DNA) e um gene de função desconhecida, θ_1 (figuras 4 e 5) (Lauer *et al*, 1980; Proudfoot & Maniatis, 1980).

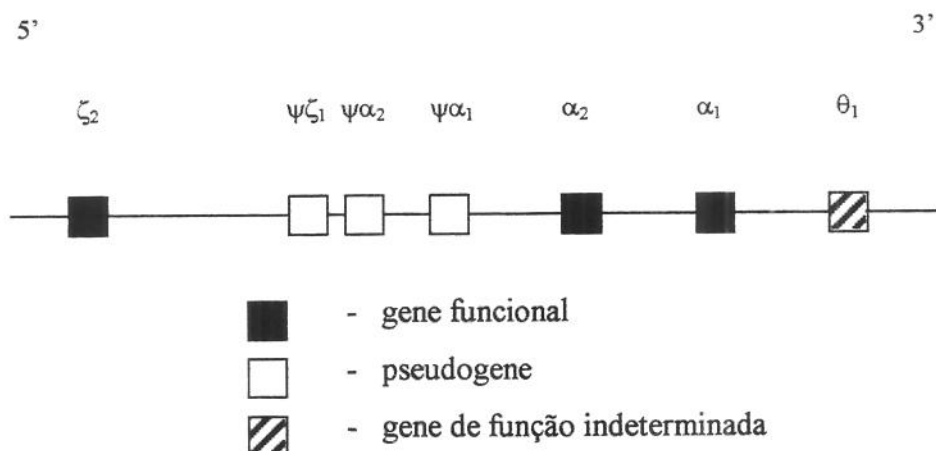


Figura 4: AGRUPAMENTO α (braço curto do cromossomo 16) (adaptado de Liebhaber, 1989)

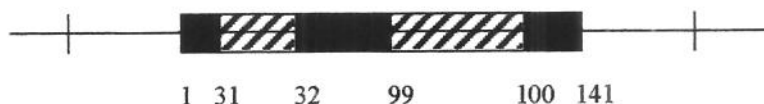


Figura 5: GENES DA GLOBINA α – ESTRUTURA (adaptado de Embury, 1988)

Os genes α_2 e α_1 são resultantes de um evento de duplicação de um gene ancestral, ocorrido há cerca de 270 milhões de anos atrás (Michelson & Orkin, 1983; Higgs *et al*, 1984 e 1989). As seqüências dos genes α permaneceram idênticas durante a evolução, apesar de divergirem de outras espécies (Sawada and Schmid *et al*, 1986). Os dois mecanismos combinados de evolução, *crossing over* e conversão, contribuíram para a homologia entre esses genes (Michelson & Orkin, 1983; Higgs *et al*, 1984). A análise da seqüência de DNA do *cluster* α mostrou que os genes α_2 e α_1 estão contidos em duas unidades de duplicação altamente homólogas de 4 Kb (Lauer *et al*, 1980), e que essas regiões são divididas em 3 subsegmentos homólogos (X, Y e Z), separados por três segmentos não homólogos (I, II, e III) (Fig 6) (Higgs *et al*, 1984 e 1989). Os 3 *exons* e o primeiro *intron* dos dois genes α têm seqüências idênticas; as diferenças são representadas apenas por uma inserção de 7 nucleotídeos próxima à região 3' do *intron* 2 do gene α_1 , por uma substituição de base neste mesmo *intron*, nas posições 509 e 573 (a partir do sítio CAP), e a maior divergência (17%) está na região 3' não traduzida dos genes α (*downstream*), após o terceiro *exon* (Michelson & Orkin, 1983). Acredita-se que, por causa dessa divergência na região 3', o nível de expressão de mRNA do gene α_2 exceda à do gene α_1 em uma proporção de 2,6:1 (Liebhaber *et al*, 1986; Molchanova *et al*, 1994). Devido ao alto grau de homologia, os genes α codificam cadeias globínicas idênticas, com 141 aminoácidos, e, embora esses genes sejam duplicados, para que a síntese das cadeias α se dê de forma balanceada, é necessária a expressão dos 4 genes no genoma diplóide (Bunn & Forget, 1986).

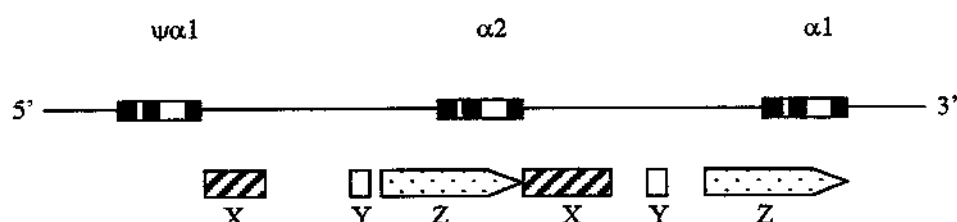


Figura 6: Os subsegmentos homólogos X, Y, Z, contendo os genes α (Embury, 1988)

1.4.2. As bases moleculares da talassemia α

As principais alterações genéticas que determinam a deficiência de produção das cadeias α da hemoglobina são atribuídas a uma variedade de mecanismos: mutações no *codon* de iniciação dos genes α , abolindo a tradução do mRNA; mutações em sítio de *splicing*, impedindo o correto processamento do mRNA; mutações que afetam o *codon* de terminação, levando à formação de cadeias α alongadas, instáveis e com menor ritmo de síntese; mutações de ponto em regiões codificantes, com substituições de aminoácidos, resultando na produção de hemoglobinas instáveis; mutações no sítio de Poli -A (descritas no gene α_2), que produzem mRNAs instáveis e afetam a expressão do gene α_1 adjacente; deleções envolvendo seqüências controladoras que regulam a expressão de ambos os genes; e deleções gênicas envolvendo 1 ou ambos os genes α . Estas últimas são as causas mais frequentes de talassemia α , sendo responsáveis por grande parte dos casos, e sua expressividade clínica dependerá da natureza da alteração produzida e do número de genes afetados (Kattamis *et al*, 1996).

Considerando que indivíduos normais apresentam 4 genes α funcionais por genoma diplóide (genótipo $\alpha\alpha/\alpha\alpha$) (Orkin *et al*, 1978), as talassemias α são classificadas de acordo com o grau de expressão destes genes (Orkin *et al*, 1978). Enquanto a inativação de um dos 2 genes α no cromossomo determina a talassemia α^+ , quando ambos os genes são afetados, a condição é denominada talassemia α^0 (Pressley *et al*, 1980; Higgs, 1993).

A talassemia α^+ é mais frequentemente causada pela deleção de um fragmento de 3.7 Kb de DNA (deleção $-\alpha^{3.7}$), envolvendo a região 3' do gene α_2 e 5' do gene α_1 , resultando em um único gene α , híbrido ($\alpha_2-\alpha_1$). A segunda causa mais comum deste tipo de talassemia, é a deleção de 4.2 Kb de DNA (deleção $-\alpha^{4.2}$), que remove totalmente o gene α_2 (Embury *et al*, 1980). O mecanismo que leva à estas deleções é a elevada homologia entre as regiões duplicadas do *cluster* α , provocando um pareamento incorreto dos cromossomos na meiose (Higgs *et al*, 1984). Assim, a homologia facilita o desalinhamento, que é seguido de recombinação entre os dois cromossomos 16, levando a um *crossing over* desigual, e à perda de um dos genes de um cromossomo ($-\alpha$) com a correspondente integração no outro cromossomo, ocasionando o evento da triplicação ($\alpha\alpha\alpha$) (Higgs *et al*, 1984).

Se o *crossing-over* ocorre entre as regiões homólogas Z, o produto da deleção é sempre um gene híbrido $\alpha_2\text{-}\alpha_1$ que perde 3.7 Kb de DNA à direita do gene α_2 (*rightward deletion*), produzindo o haplótipo $-\alpha^{3.7}$ ou cromossomos com 3 genes alfa ($\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$). Se a recombinação ocorre entre os segmentos X, resulta na perda de 4.2 Kb à esquerda do gene α_2 (*leftward deletion*), determinando o haplótipo $-\alpha^{4.2}$ ou seu correspondente triplicado ($\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 4.2}$) (Higgs *et al*, 1984 e 1989; Dodé *et al*, 1993). A figura 7 mostra o *crossing over* entre cromossomos desalinhados, originando os haplótipos mais comuns da talassemia α^+ . Com relação à deleção $-\alpha^{3.7}$, dependendo da região exata do segmento Z onde o *crossing-over* ocorre, ela é dividida em 3 diferentes subtipos: I, II e III. A análise de restrição com a enzima Apa I diferencia esses haplótipos, conforme demonstrado na figura 8 (Dodé *et al*, 1993; Baysal & Huisman, 1994). O haplótipo I foi observado em todas as populações estudadas; o II foi encontrado na Jamaica, no Sudeste Asiático e no Mediterrâneo, e o III apenas na Melanésia e Polinésia (Higgs *et al*, 1984).

A deleção $-\alpha^{3.7}$ é a causa mais comum de talassemia α^+ , e tem distribuição mundial, com frequências muito elevadas na região do Mediterrâneo e África; já a deleção $-\alpha^{4.2}$ tem prevalência elevada na população do Sudeste Asiático (Fucharoen & Winichagoon, 1987), embora também ocorra, com menor frequência, no Mediterrâneo.

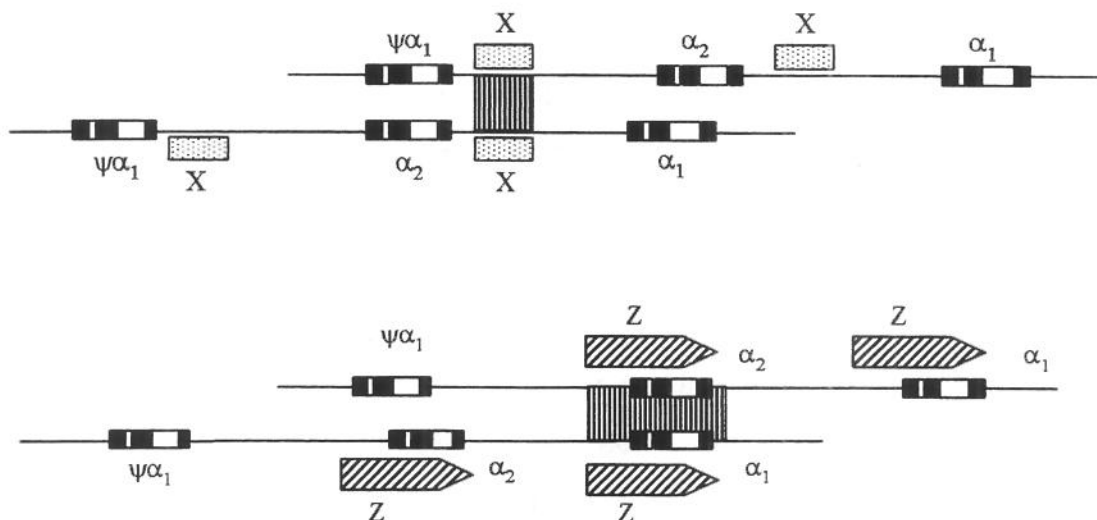


Figura 7: Cromossomos desalinhados, originando os haplótipos $-\alpha^{4,2}$ e $\alpha^{4,2-anti}$ e $-\alpha^{3,7}$ e $\alpha^{3,7-anti}$ (Embury, 1988)

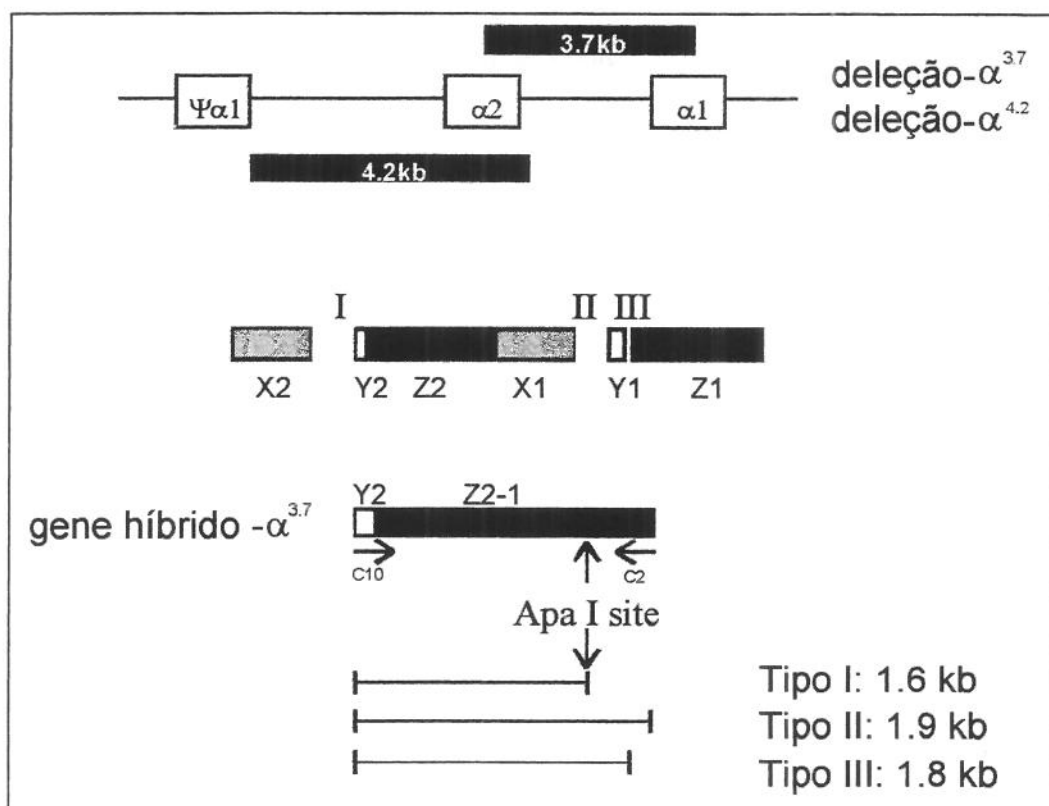


Figura 8: Localização das deleções $-\alpha^{3,7}$ e $-\alpha^{4,2}$ no α cluster e sítio de restrição da enzima Apa I, definindo a região exata do *crossing over* no segmento Z (adaptado de Dodé *et al*, 1993 e Baysal & Huisman, 1994)

Eventos de recombinação não homóloga são as causas das deleções responsáveis pela talassemia α^0 . A maioria remove ambos os genes α do mesmo cromossomo, determinando o haplótipo (--). As duas mais comuns são as deleções ($--^{MED}$), freqüente na Bacia do Mediterrâneo (Nicholls *et al*, 1985), onde 18 Kb do cluster α são removidos entre as regiões 5' do pseudogene ζ_1 e a região 5' do gene θ_1 (Orkin *et al*, 1980; Kattamis *et al*, 1996), e ($--^{SEA}$), a mais freqüente forma de talassemia α^0 do Sudeste Asiático (Fucharoen & Winichagoon, 1987), que remove aproximadamente 20 Kb de DNA, envolvendo os pseudogenes α_2 e α_1 , os genes α_2 e α_1 e o gene θ_1 (Kattamis *et al*, 1996). Também são causas de talassemia α^0 , deleções que removem totalmente 1 gene α e parcialmente o outro, tornando-o inativo, determinando o haplótipo $-(\alpha)$. Como exemplo, temos as deleções $-(\alpha)^{20.5}$ (Nicholls *et al*, 1985) e $-(\alpha)^{5.2}$, que envolvem todo o gene α_2 e a porção 5' do gene α_1 , o qual não pode se expressar (Pressley *et al*, 1980). Ambas são de origem Mediterrânea, sendo a primeira mais frequentemente encontrada (Higgs *et al*, 1989). A figura 9 mostra as principais deleções descritas no cluster α , que causam supressão total ou parcial na síntese de cadeias α .

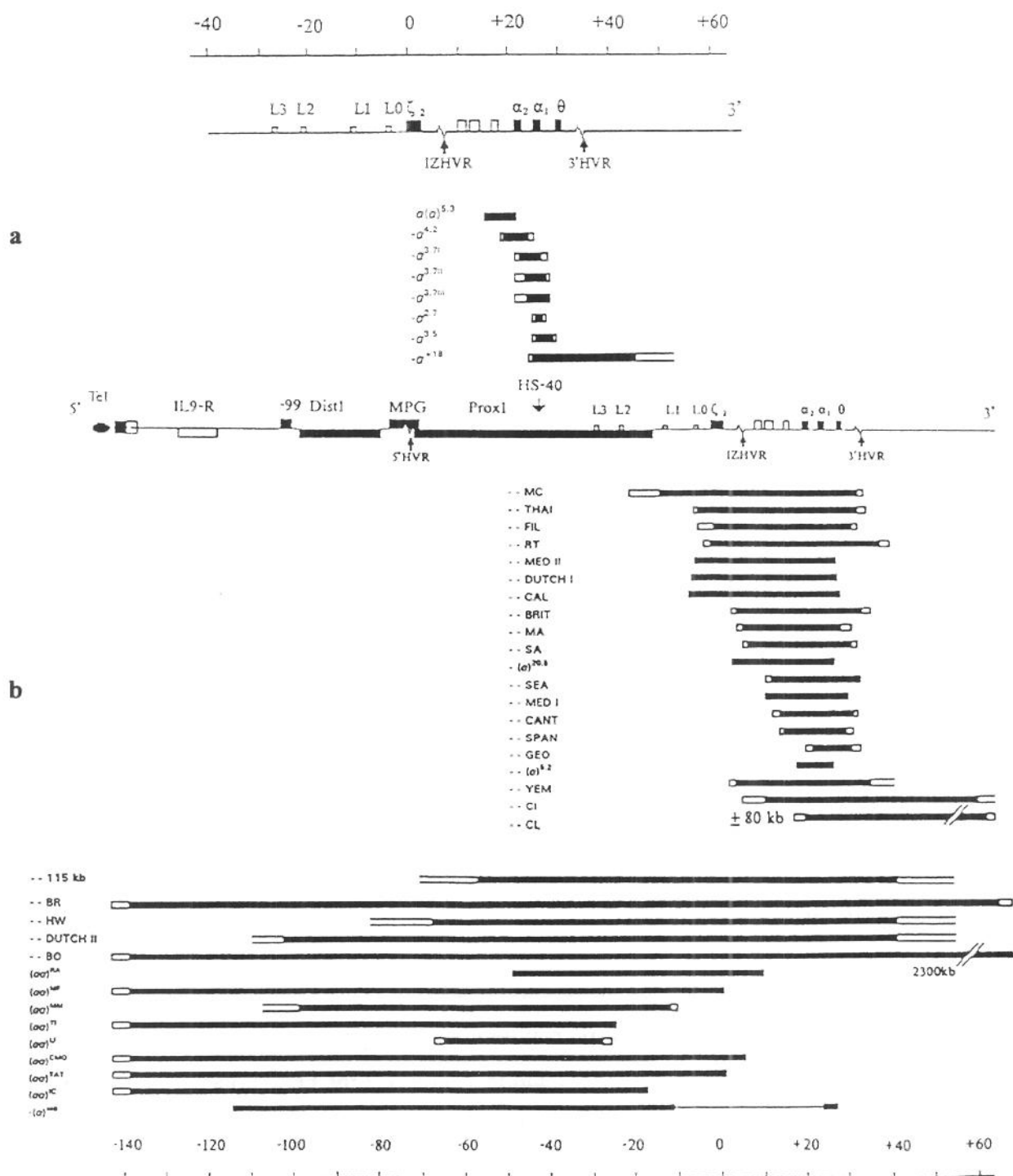


Fig. 9 – Principais deleções que causam talassemia α

a: deleções que removem um dos genes α do genoma haplóide, causando talassemia α^+

b: remoção ou inativação dos dois genes α , causando talassemia α^0

(Adaptado de Giordano, 1998 – Tese de Doutorado)

1.4.3. Talassemia α não-delecional

Muitas mutações de ponto ou deficiências de um ou alguns nucleotídeos podem interferir na expressão dos genes α , levando a um quadro de talassemia. Essas mutações interferem na transcrição ou no processamento do mRNA, ou causam a instabilidade pós-transcricional da cadeia α variante (Traeger-Synodinos *et al*, 1993; Stamatoyannopoulos *et al*, 1994; Harteveld *et al*, 1997).

A transcrição inicial de um gene inclui seus *introns* e *exons*. O transcrito é então modificado pelo acréscimo de seqüências não traduzidas na extremidade 5', a estrutura CAP, e na região 3', a cauda de Poli A (AATAAA), que possivelmente aumenta a estabilidade do mRNA no citoplasma; do transcrito primário (pré-mRNA), na passagem do núcleo para o citoplasma, são removidos os *introns*, processo conhecido por *splicing* ou processamento. Para que esse processo ocorra eficientemente, atuam como sítios de reconhecimento os dinucleotídeos GT (sítio doador) e AG (sítio aceptor), precedidos por seqüências ditas "de consenso". Mutações envolvendo essas invariáveis seqüências impedem o correto processamento do mRNA (Orkin *et al*, 1981; Brunak *et al*, 1991; Harteveld *et al*, 1996). Uma forma comum de talassemia α não-delecional, por exemplo, a $\alpha^{\text{Hph}}\alpha$, resulta de uma deficiência de 5 nucleotídeos abrangendo a região 3' do primeiro *exon* e 5' do primeiro *intron* do gene α_2 , afetando o *splicing donor site* (GAGGTGAGG $\rightarrow$ GAGG-----). Esta mutação pode ser reconhecida por análise de restrição com a enzima Hph I (Orkin *et al*, 1981).

Mutações no sítio de Poli A, altamente conservado, interferem no processamento correto do mRNA, que é degradado prematuramente (Fitzgerald *et al*, 1981). Uma mutação, descrita pela primeira vez na Arábia Saudita e posteriormente encontrada em diferentes áreas do Mediterrâneo ($\alpha^{\text{T Saudi}}\alpha$) (Yuregir, *et al*, 1992; Kattamis *et al*, 1996), é resultante de uma substituição de adenina por guanina nesta seqüência (AATAAA $\rightarrow$ AATAAG), que prejudica a produção do mRNA do gene α_2 e possivelmente diminui a expressão do gene α_1 adjacente (Thein *et al*, 1988; Yüregir *et al*, 1992; Harteveld *et al*, 1993; Kattamis *et al*, 1996).

O mRNA maduro, totalmente processado, é traduzido no citoplasma, em proteínas. Mutações no código de iniciação impedem a correta tradução (Olivieri *et al*, 1987; Higgs *et al*, 1989). Duas formas não deletoriais de talassemia $\alpha, \alpha^{\text{NcoI}} \alpha$ e $\alpha \alpha^{\text{NcoI}}$, encontradas em muitas populações mediterrâneas (Kattamis *et al*, 1996) são causadas pela substituição de base no código de iniciação, de ATG para ACG e GTG nos genes α_2 e α_1 , respectivamente (Pirastu *et al*, 1984; Moi *et al*, 1987).

Substituições de base no código de terminação da cadeia - TAA, também levam a um quadro de talassemia α (Higgs *et al*, 1989). Uma modificação neste *codon* permite a introdução de mais aminoácidos, resultando em cadeias alongadas, instáveis e com ritmo de síntese diminuído, determinando assim um fenótipo talassêmico (Hunt *et al*, 1982). A exemplo disto, uma mutação descrita na região Mediterrânea, onde TAA foi substituído por AAA no gene α_2 , origina a Hb Icária (α_2 TAA $\rightarrow$ AAA) uma hemoglobina instável cuja redução no ritmo de síntese leva a um quadro de talassemia α^+ (Efremov *et al*, 1990). Outras 4 mutações no *codon* 142 do gene α_2 foram descritas: Hb Constant Spring, no Sudeste Asiático (TAA $\rightarrow$ CAA) (Clegg *et al*, 1971); Hb Koya Dora, de origem indiana (TAA $\rightarrow$ TCA) (De Jonge *et al*, 1975); Hb Seal Rock, encontrada em uma família negra (TAA $\rightarrow$ GAA) (Brandley *et al*, 1975); e a Hb Pa Ksé, descrita em um indivíduo do Laos (TAA $\rightarrow$ TAT) (Waye *et al*, 1994).

Mutações que afetam resíduos envolvidos na região de contato $\alpha_1\beta_1$ resultam em uma ligação anormal entre as cadeias α e β , gerando uma globina instável que é rapidamente proteolizada se não for incorporada ao tetrâmero (Williamson, 1993). Algumas variantes, como as Hbs Evanston (Honig *et al*, 1984) e Quong Sze (Goossens *et al*, 1982), são causadas por mutações de ponto que acarretam uma elevada instabilidade da molécula (Kattamis *et al*, 1996). As formas não-deletoriais de talassemia α já descritas encontram-se relacionadas no Quadro I.

O Elemento Regulatório (α -MRE, ou HS-40), um segmento de DNA restrito à 310 pares de base localizado a 40 kb do sítio Cap do gene ζ_2 em direção ao centrômero do cromossomo 16, está envolvido na regulação da expressão dos genes α (Higgs, 1993).

Mutações nesta região, altamente conservada, silenciam o *locus*, e os genes, embora estruturalmente intactos, não se expressam, determinando um quadro de talassemia α (Romao *et al*, 1991). Até o momento, nove diferentes deleções que afetam esta região são conhecidas, e os mecanismos envolvidos são bastante diversos e representados por eventos de recombinação entre regiões parcialmente homólogas (*Alu repeats*), ou pelo truncamento da extremidade do cromossomo 16, ou ainda por eventos de deleções *de novo* (Higgs, 1993; Giordano, 1998).

QUADRO 1 - FORMAS NÃO DELECIONAIS DE TALASSEMIA α

(adaptada de Hartevel, 1997 – Tese de Doutorado)

TIPO DE MUTAÇÃO	FENÓTIPO	ORIGEM RACIAL
Processamento de RNA		
① Mutações no sítio de "splicing"		
α_2 IVS 1 (-5nt) - sítio doador (GAGGTGAGG→GAGG-----)	α^+	Mediterrânea Oriente Médio
α_2 IVS 1 - 116 - sítio acceptor (GCAGGA→GCGGGA)	α^+	Norte da Europa
α_1 IVS 1 - 117 - sítio acceptor (GCAGGA→FCAAGA)	α^+	Indiana
α_2 cd26 (GCG→ACG) (Ala→Tre)	α^+	Italiana
α_1 IVS 1 - 1 - sítio doador (AGGT→AGAT)	α^+	Tailandesa
② Mutações no sítio de Poly A		
α_2 (AATAAA→AATAAG)	α^+/α^0	Med; O. Médio
α_2 (AATAAA→AATGAG)	α^+/α^0	Mediterrânea
α_2 (AATAAA→AATA--)	α^+/α^0	Indiana
α_2 (-16 pb: CATAAA)	α^+/α^0	Árabe
Tradução do RNA		
① Mutação em código de iniciação		
α_2 (ATG→ACG)	α^+	Mediterrânea
α_2 (ATG→A-G)	α^+	Vietnamita
α_1 (ATG→GTG)	α^+	Mediterrânea
$-\alpha^{3,7}$ (ATG→GTG)	α^0	Negros
$-\alpha^{3,7}$ II (-ac)	α^+/α^0	Mediterrânea; Norte da África
② Mutação em código de terminação		
α_2 cd 142 (TAA→CAA)		
Hb Constant Spring	α^+	Sudeste Asiático
α_2 cd 142 (TAA→AAA)		
Hb Icaria	α^+	Mediterrânea
α_2 cd 142 (TAA→TCA)		
Hb Koya Dora	α^+	Indiana
α_2 cd 142 (TAA→GAA)		
Hb Seal Rock	α^+	Negros
α_2 cd 142 (TAA→TAT)		
Hb Paksé	α^+	Laos

③ Mutação "frameshift"

α_2 cd 39/41		
(-9pb, + 8pb em duplicação)	α^+	Judeus
$-\alpha^{3.7}$ cd30/31		
(GAGAGG→GAG--G)	α^0	Africana

④ Mutação "nonsense"

α_2 cd 116 (GAG→TAG)	α^+	Africana
-----------------------------	------------	----------

Mutações causando instabilidade pós-transcricional

① Devido à mutações de ponto

α_1 cd 14 TGG→CGG (Trp→Arg)	α^+	Indiana
$-\alpha^{3.7}$ cd 14 TGG→CGG (Trp→Arg)		
Hb Evaston	α^+	Negros
α_2 cd 29 CTG→CCG (Leu→Pro)		
Hb Agrinio	α^+	Grega
α_2 cd 59 GGC→GAC (Gli→Asp)	α^+	Sudeste Asiático
α_1 cd 59 GGC→GAC		
Hb Adana	α^+	Mediterrânea
α_2 cd 93 GTG→GGG (Val→Gli)		
Hb Bronte	α^+	Itália
α_2 cd 104 TGC→TAC (Cis→Tir)		
Hb Sallanches	α^+	Mediterrânea
α_2 cd 109 CTG→CGG (Leu→Arg)		
Hb Suan Dok	α^+	Sudeste Asiático
α cd 110 GCC→GAC (Ala→Asp)		
Hb Petah Tikva	α^+	Judeus / Iraquianos
α_2 cd 125 CTG→CGG (Leu→Pro)		
Hb Quong Sze	α^+	Sudeste Asiático
$-\alpha^{3.7}$ cd 125 CTG→CAG (Leu→Gln)	α^0	Judeus e Curgos
α_2 cd 129 CTG→CCG (Leu→Pro)		
Hb Utrecht	α^+	Desconhecida
α_2 cd 129 CTG→CCG (Leu→Pro)		
α_1 cd 129 CTG→CCG (Leu→Pro)		
Hb Tunis-Bizerte	α^+	Norte da África
α_2 cd 131 TCT→CCT (Ser→Pro)		
Hb Questembert	α^+	Iugoslava

② Devido à pequenas deleções

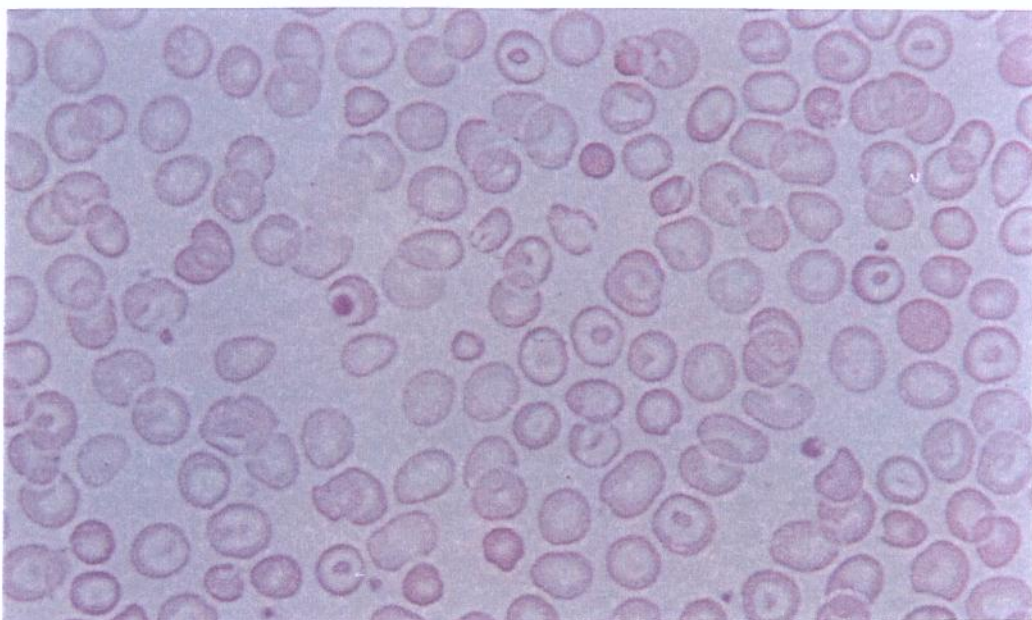
α_2 cd 30 (-GAG, Glu)	α^+	Sudeste Asiático
α_1 cd 62 (-GTG, Val)	α^+	Gregos
α_2 cd 113 / 116 (-12pb)		
Hb Lleida	α^+	Espanhóis

1.4.4. Diferentes formas clínicas

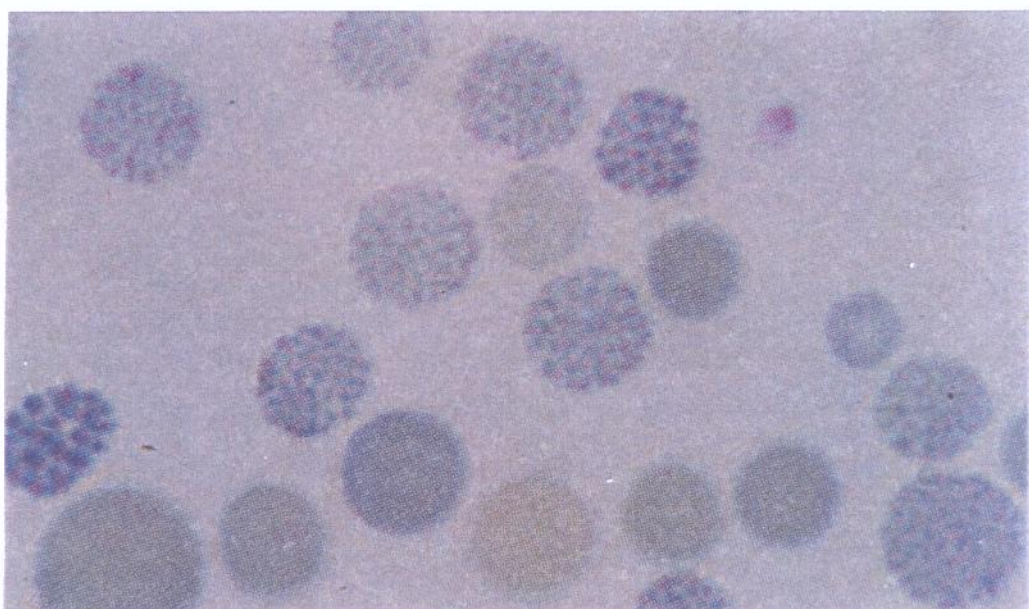
Do ponto de vista clínico, existem 3 formas de talassemia α : traço talassêmico α (α^+ e α^0), Doença da Hb H e Síndrome da Hidropisia Fetal por Hb Bart's (Bunn & Forgett, 1986; Williams *et al*, 1990).

O traço talassêmico α^+ ($-\alpha/\alpha\alpha$) resulta em uma talassemia clinicamente silenciosa, que, por seu caráter assintomático, pode não ser detectada por técnicas laboratoriais convencionais, já que o perfil hematológico e eletroforético dos portadores, geralmente, não mostra nenhuma alteração. Estes indivíduos podem apresentar, ao nascimento, de 1 a 3% de Hb Bart's e, em alguns casos, discretas microcitose e hipocromia na vida adulta (Williams *et al*, 1990). O traço talassêmico α^0 , causado pela perda de 2 genes *in cis* ($--/\alpha\alpha$), também não resulta em manifestações clínicas, e é hematologicamente detectável através do aspecto microcítico e hipocrômico das hemácias. Seus portadores apresentam de 5 a 10% de Hb Bart's ao nascimento. Este quadro laboratorial é similarmente apresentado pelos homozigotos da talassemia α^+ , ou seja, indivíduos que perderam 2 genes α *in trans* ($-\alpha/-\alpha$) (Williams *et al*, 1990; Stamatoyannopoulos *et al*, 1994).

A Doença da Hb H é causada pela interação entre os determinantes talassêmicos α^0 e α^+ ($--/-\alpha$). Os portadores desta síndrome tem morfologia eritrocitária alterada, com microcitose, hipocromia, e poiquilocitose moderadas, e a presença de hemácias policromatófilas e em alvo no sangue periférico (Fig. 10A), além de manifestações clínicas que incluem anemia hemolítica crônica de intensidade moderada e esplenomegalia (Bunn & Forgett, 1986; Williams *et al*, 1990). O perfil eletroforético revela de 25 a 30% de Hb Bart's ao nascimento, que é substituída, durante os primeiros meses de vida, pela Hb H, de 5 a 30% na vida adulta. A elevada instabilidade desta Hb e a formação dos corpos de inclusão (Fig. 10B) são os responsáveis pelo quadro clínico dos portadores (Bunn & Forgett, 1986; Williams *et al*, 1990).



A



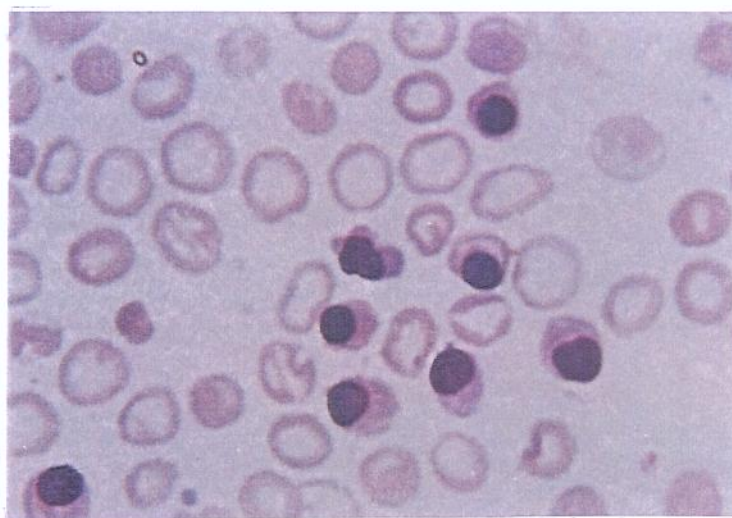
B

Figura 10: **A** : esfregaço de sangue periférico na Doença da Hb H mostrando moderadas microcitose, hipocromia, poiquilocitose e células em alvo. **B**: esfregaço de sangue periférico na Doença da Hb H corado com azul brilhante de cresil, mostrando os corpos de inclusão. (adaptado de Hoffbrand & Pettit, 1995)

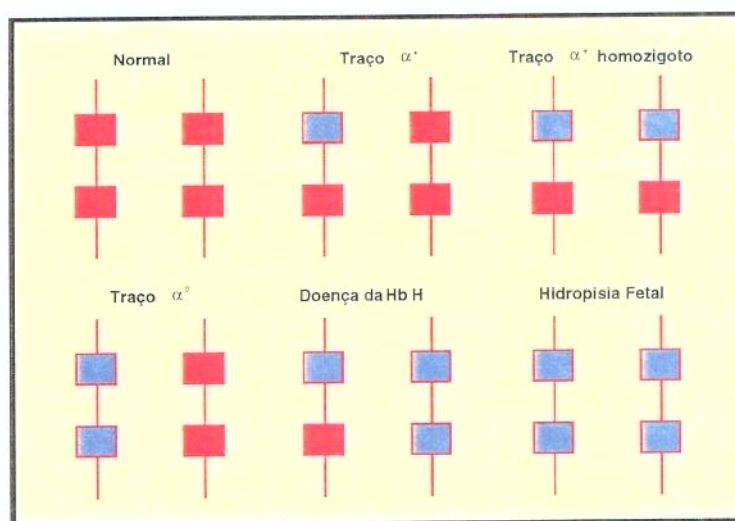
A forma homozigótica da talassemia α^0 correspondente à Hidropisia Fetal por Hb Bart's; é a forma mais grave das síndromes talassêmicas, sendo causa constante de abortos ou morte logo após o nascimento nas populações onde o alelo α^0 tem alta prevalência (Randhawa *et al*, 1984). Neste caso, a eletroforese mostra a presença de quase 100% de Hb Bart's, com pequenas quantidades de Hb Portland e traços de Hb H (Randhawa *et al*, 1984 ; Higgs *et al*, 1989). A Hb Bart's, em função de sua elevada afinidade pelo oxigênio, não é eficaz na oxigenação tecidual, causando hipóxia, hepatoesplenomegalia, ascite e hidropisia, o que leva à morte fetal ou neonatal (Chan *et al*, 1985; Bunn & Forget, 1986; Chang *et al*, 1991). O estudo do sangue periférico revela uma morfologia eritrocitária acentuadamente alterada, com intensas hipocromia, anisopoiquilocitose, policromatofilia e a presença de eritroblastos em elevada porcentagem (Fig 11A). Essa doença é relativamente freqüente no Sudeste Asiático, também ocorrendo na região do Mediterrâneo (Paglietti *et al*, 1986; Fucharoen & Winichagoon, 1987). Os genótipos, aspectos clínicos e laboratoriais encontram-se sumarizados na Fig. 11B e no Quadro II e na Fig. 11B.

**QUADRO 2 - GENÓTIPOS X ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA
TALASSEMIA α**

TIPOS	GENÓTIPOS	ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS
Talassemia α^+ Heterozigótica	$-\alpha/\alpha\alpha$ (ou $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$)	0 - 3% de Hb Bart's ao nascimento; alterações hematológicas mínimas ou ausentes no adulto.
Talassemia α^+ Homozigótica	$-\alpha/-\alpha$ (ou $\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$)	5 - 10% de Hb Bart's ao nascimento; discretas microcitose e hipocromia no adulto.
Talassemia α^0 Heterozigótica	$--/\alpha\alpha$	5 - 10% de Hb Bart's ao nascimento; discretas microcitose e hipocromia no adulto.
Talassemia α^0 Homozigótica	$--/--$	cerca de 80% de Hb Bart's; traços de Hb H e Hbs Portland I e II; Hidropisia Fetal por Hb Bart's.
Interação α^+/α^0	$--/-\alpha$ (ou $--/\alpha^T\alpha$)	25 - 50% de Hb Bart's ao nascimento; 5 - 30% de Hb H na vida adulta; Doença da Hb H



A



B

Figura 11: A: esfregaço de sangue periférico da tal α^0 homozigótica mostrando acentuadas hipocromia, policromasia e eritroblastos circulantes. B: representação esquemática dos genótipos da Talassemia α . (adaptado de Hoffbrand & Pettit, 1995)

1.4.5. Distribuição mundial da talassemia α

Devido às dificuldades em se identificar os genótipos da talassemia α por meio de técnicas laboratoriais convencionais, somente com o advento da análise de DNA foi possível determinar mais precisamente a distribuição e a frequência desta alteração, altamente difundida em diferentes partes do mundo (Stamatoyannopoulos *et al*, 1994).

A Talassemia α é possivelmente o distúrbio genético mais comum cuja distribuição é limitada às regiões tropicais e subtropicais, embora casos esporádicos tenham sido encontrados fora dessas regiões (Higgs *et al*, 1989). Nesses locais, ocorre com incidência elevada entre os povos da Ásia e Oceania (China, Tailândia, Índia, Malásia, Melanésia, Polinésia, Nova Guiné) (Na-Nakorn *et al*, 1970; Hill *et al*, 1985; Fucharoen *et al*, 1988; Winichagoon *et al*, 1988; Wu *et al*, 1988; Zeng *et al*, 1988; Hundrieser *et al*, 1990), do Oriente Médio (Turquia, Arábia Saudita) (Pembrey *et al*, 1975; Ozsoylu *et al*, 1982), e da Região do Mediterrâneo, principalmente Grécia e Itália (Guanti *et al*, 1983; Velati *et al*, 1983; Galanello *et al*, 1984; Kanavakis *et al*, 1986; Di Rienzo *et al*, 1986). No continente africano, tem distribuição praticamente universal (Folayan-Esan *et al*, 1970 e 1972; Nhonoli *et al*, 1979; Piliszek *et al*, 1979; Henni *et al*, 1982; Mathew *et al*, 1983; Rousseau *et al*, 1985; Henni *et al*, 1987). Na América foi descrita em vários países, como Estados Unidos, Canadá, México, Cuba, Costa Rica, Jamaica, Colômbia, Peru e Brasil (Echavarria *et al*, 1976; Martinez & Colombo, 1976; Angles *et al*, 1977; Sáenz *et al*, 1979; Colombo *et al*, 1981; Higgs *et al*, 1981; Wong *et al*, 1981; Johnson *et al*, 1982; Zago e cols, 1983 e 1984; Zago & Costa, 1985; Pedrollo e cols, 1988; Costa e cols, 1989; Sonati e cols, 1990). A deleção $-\alpha^{3.7}$, como já referido, é a mais comum condicionante de talassemia α na maioria das populações investigadas. No Sudeste Asiático e nas ilhas do Pacífico predomina a mutação $-\alpha^{4.2}$ (Liebhaber, 1989). Além dessas, outras mutações, esporádicas, têm sido descritas em diferentes regiões, como as deleções $-\alpha^{3.5}$ e $-\alpha^{2.7}$ (Kulozik *et al*, 1988; Zhao *et al*, 1991).

Por outro lado, aquelas mutações que causam talassemia α^0 têm distribuição geográfica limitada às regiões do Mediterrâneo e parte do Sudeste Asiático, onde são observadas ocorrências da Hidropisia Fetal por Hb Bart's (Fucharoen & Winichagoon, 1987; Liebhaber, 1989).

No Continente Americano, devido à diversidade étnica, como esperado, também foram descritos casos de talassemia α que, como nas demais populações, têm como causa prevalente a deleção $-\alpha^{3.7}$ (Echavarria *et al*, 1976; Martinez & Colombo, 1976; Angles *et al*, 1977; Sáenz *et al*, 1979; Colombo *et al*, 1981; Higgs *et al*, 1981; Wong *et al*, 1981; Johnson *et al*, 1982; Zago e cols, 1983 e 1984; Zago & Costa, 1985; Pedrollo e cols, 1988; Costa e cols, 1989; Sonati e cols, 1990; Sonati e cols, 1991; Sonati e cols, 1992; Sonati e cols, 1996). A distribuição mundial da talassemia α encontra-se representada na figura 12a.

A elevada prevalência da talassemia α^+ em várias partes do mundo onde a malária é comum sugere a existência de um mecanismo seletivo e protetor em algumas populações (Higgs *et al*, 1989; Liebhaber *et al*, 1989). Embora a base para a seleção do cromossomo $-\alpha$ nas zonas endêmicas da malária não esteja totalmente definida, foi possível demonstrar a diminuição significativa do crescimento do *Plasmodium falciparum* em células vermelhas de indivíduos com Doença da Hb H, mantidas em cultura (Liebhaber *et al*, 1989). A figura 12b mostra a distribuição geográfica da malária.

1.4.6. A talassemia α no Brasil

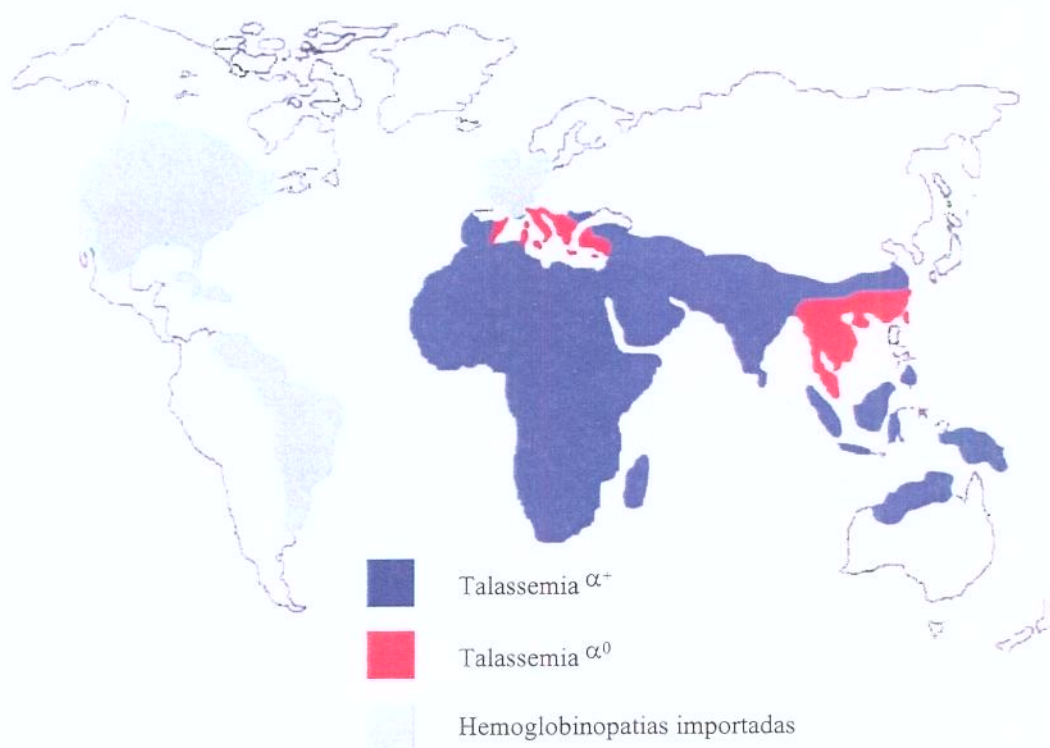
Há poucos estudos realizados no Brasil sobre a prevalência e as diferentes formas de talassemia α . O primeiro estudo efetuado, por Sonati e cols, publicado em 1990, mostrou a elevada frequência da deleção $-\alpha^{3.7}$ na população negróide do Sudeste Brasileiro, através da determinação dos níveis de Hb Bart's em sangue de cordão umbilical de 320 recém-nascidos. Do total analisado, 11,9% apresentaram quantidades detectáveis de Hb Bart's, sendo 10,3% com níveis entre 1,0 e 3,5% de Hb anômala (considerados heterozigotos da talassemia α^+) e 1,6% entre 5,0 e 10% (homozigotos). A frequência de homozigotos permitiu estimar que cerca de 22% desta população seria heterozigota da deleção $-\alpha^{3.7}$, muito embora, pela metodologia empregada, apenas a metade dos casos foi detectada. Estas estimativas foram confirmadas por um segundo estudo que, analisando doadores de sangue negróides, empregou técnicas de Biologia Molecular (Southern Blotting) (Sonati e cols, em 1991). Em 1989, Costa e cols investigaram a frequência desta mesma deleção em pacientes com anemia falciforme desta mesma região do país. A frequência encontrada do alelo $-\alpha^{3.7}$ foi também de 22%.

Casos esporádicos da Doença da Hb H têm sido descritos (Sonati e cols, 1992; Zago e cols, 1984; Sonati e cols, 1996); a análise molecular dos mesmos revelou a presença das deleções $-\alpha^{3.7}$ e $--^{MED}$ em nossa população.

Com relação à Hidropisia Fetal por Hb Bart's, não houve, até o presente momento, nenhuma descrição na população brasileira, fato esse que pode ser atribuído, provavelmente, à baixa frequência dos alelos α^0 .

O objetivo do presente estudo foi determinar as bases moleculares das alterações estruturais e talassêmicas nos genes da globina α em uma população brasileira.

a.



b.

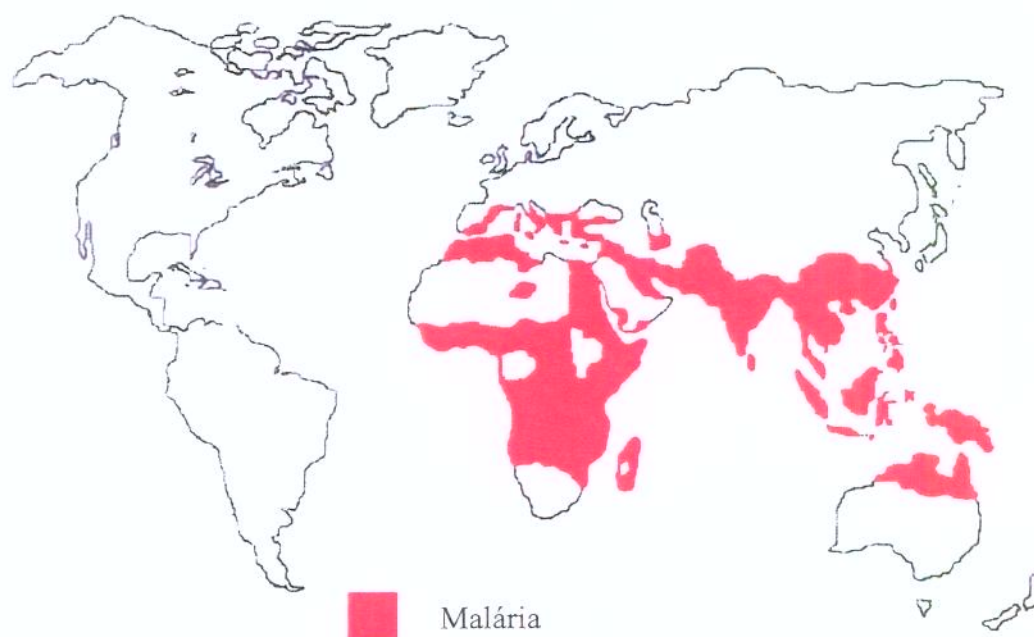


Fig. 12 - a: distribuição mundial da Talassemia α e hemoglobinopatias importadas
b: distribuição geográfica da Malária.
(adaptado de Hartevel, tese PhD, 1997)

CAPÍTULO 1

α -Globin Genes: Thalassemic and Strutural Alterations in a Brazilian Population

(submetido ao periódico *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*)

17/12/99

Brazilian Journal
of Medical and Biological Research
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Av. Bandeirantes, 3900
14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brasil
Telephone/Fax (016)633-3825
E-Mail: bjournal@fmrp.usp.br

ON LINE VERSION
<http://www.scielo.br/bjmr.htm>
<http://www.epub.org.br/bjmr/>

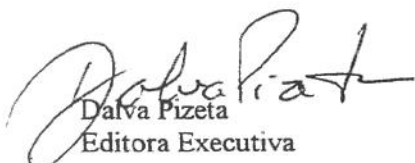
Profa.Dra. Maria de Fátima Sonati
Departamento de Patologia Clínica
Faculdade de Ciências Médicas(FCM)
Universidade Estadual de Campinas
UNICAMP
Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas, SP

Ref.: MS3754 alfa-Globin Genes: Thalassemic and structural alteratons in a Brazilian population. M.R.S.C. Wenning, E.M. Kimura, F.F. Costa, S.T.O. Saad, S. Gervásio, S.B. de Jorge, E. Borges, N.M. Silva, Maria de Fátima Sonati

Prezada Dra. Maria de Fátima:

Temos a satisfação de comunicar a V.Sa. o recebimento do artigo acima mencionado, o qual se encontra em processo de análise de acordo com as normas da Revista. Favor utilizar o número da referência em futuras correspondências.

Atenciosamente,


Dalva Pizeta
Editora Executiva

α -Globin Genes: Thalassemic and Structural Alterations in a Brazilian Population

M.R.S.C. Wenning¹, E.M. Kimura¹, F.F.Costa², S.T.O. Saad², S. Gervásio¹, S.B. de Jorge¹, E. Borges¹, N.M. Silva¹, M.F.Sonati¹

¹Departamento de Patologia Clínica, ²Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

Research supported by FAPESP (grant nº 96/1118-8) and CNPq (grant nº 520059/95-6)

Correspondence to: M.F.Sonati, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6111, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil. Phone: (55)(19) 788-7064, Fax: (55)(19) 289-3273, e-mail: sonati@fcm.unicamp.br

Running title: Structural and thalassemic alterations in α -globin genes

Key Words: α -globin genes, α -globin structural variants, α -thalassemia, Hb H disease, Brazilian population

ABSTRACT

Seven unrelated patients with HbH disease and 27 individuals with α -chain structural alterations were studied to identify the α -globin gene mutations present in the population of Southeast Brazil. The $-\alpha^{3.7}$, $--^{MED}$ and $-(\alpha)^{20.5}$ deletions were investigated by PCR, whereas non-deletional α -thalassemia ($\alpha^{Hph}\alpha$, $\alpha^{NcoI}\alpha$, $\alpha\alpha^{NcoI}$, $\alpha^{Ic}\alpha$ and $\alpha^{TSaudi}\alpha$) was screened with restriction enzymes and nested PCR. Structural alterations were identified by DNA direct sequencing. Of the seven HbH disease patients, all of Italian descent, two had the $-(\alpha)^{20.5}/-\alpha^{3.7}$ genotype, one had the $--^{MED}/-\alpha^{3.7}$, one had the $--^{MED}/\alpha^{Hph}\alpha$ and three showed interaction of the $-\alpha^{3.7}$ deletion with an unusual, unidentified form of non-deletional α -thalassemia [$-\alpha^{3.7}/(\alpha\alpha)^T$]. Among the 27 patients with structural alterations, 15 (Italian descendants) had Hb Hasharon ($\alpha47Asp\rightarrow His$), associated with the $-\alpha^{3.7}$ deletion, 4 (Italian descendants) were heterozygous for Hb J-Rovigo ($\alpha53Ala\rightarrow Asp$), 4 (3 Blacks and 1 Caucasian) were heterozygous for Hb Stanleyville-II ($\alpha78Asn\rightarrow Lys$) associated with the α^+ -thalassemia, 1(Black) was heterozygous for Hb G-Pest ($\alpha74Asp\rightarrow Asn$), 1 (Caucasian) was heterozygous for Hb Kurosaki ($\alpha7Lys\rightarrow Glu$), 1 (Caucasian) was heterozygous for Hb Westmead ($\alpha122His\rightarrow Gln$) and 1 (Caucasian) was a carrier of a novel silent variant (Hb Campinas, $\alpha26Ala\rightarrow Val$). Most of the mutations found reflected the Mediterranean and African origins of the population. Hbs G-Pest and Kurosaki, very rare, and Hb Westmead, common in southern China, have been initially described in individuals with ethnic origins different from the carriers in the present study and are the first cases to be reported in the Brazilian population.

INTRODUCTION

The hemoglobinopathies are a heterogeneous group of genetic disorders caused by mutations affecting the globin-chain genes. Generically, these mutations can be classified as structural alterations which result in the production of abnormal proteins, as alterations in synthesis which modify the normal α/β globin chain ratio (thalassemias) or in the persistent production of hemoglobin (Hb) fetal during adult life (Hereditary Persistence of Hb Fetal) (1,2). The hemoglobinopathies represent a public health problem, particularly in the Mediterranean area, in the Middle East and in parts of India, Africa and Southeast Asia (3,4).

The high degree of racial admixture among native Indians and African and European descendants in the Brazilian population has produced elevated frequencies of Hb alterations, which reflect the diversity of racial origins in each region of the country (5). Clinically, HbS, Hb C and β thalassemia are the most important (6), although α^+ thalassemia ($-\alpha^{3,7}$ deletion) is the most frequent alteration, occurring in 20-25% of the Black population (7). Although sporadic cases of Hb H disease and α -chain structural variants have been found (6,8), the α -globin genes have not been systematically investigated. In this study, seven unrelated subjects with Hb H disease and 27 individuals with α -globin structural alterations were investigated in order to identify the mutations present in the population in southeastern Brazil. The Hb H disease patients and the carriers of abnormal Hbs who had hematological alterations were initially attended at the outpatients clinics at university hospital at UNICAMP and then sent to the Clinical Pathology Laboratory for diagnosis and investigation. Asymptomatic carriers were detected in a screening program in the same laboratory.

MATERIAL AND METHODS

Peripheral blood samples were collected in Vacutainers (Becton Dickinson) with EDTA as anticoagulant and hematological data were obtained with an automated cell counter (Cell Dyn 3500, Abbott).

Hb analyses were carried out by electrophoresis on cellulose acetate strips, at pH 8.9, in agar gels, at pH 6.0 (1), and by globin chain electrophoresis on acrylamide gels, at pH acid (9). Hb A₂ was measured spectrophotometrically after elution from cellulose acetate strips (1) and Hb F was determined by alkali denaturation (10). The stability of each variant was checked by the n-butanol, isopropanol and heat tests (11). Heinz bodies were investigated by incubation with methyl violet and Hb H was demonstrated by incubation with brilliant cresyl blue (11).

DNA was isolated from peripheral blood leukocytes by organic extraction. Direct sequencing was performed with the Sequenase kit version 2.0 (United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH, USA), after selective amplification of the α -globin genes by polymerase chain reaction (PCR) (12) and single strand separation with magnetic beads (Dynal Inc, Oslo, Norway). When possible, the mutations were confirmed by sequencing the opposite strand and by familial studies and restriction enzyme analyses.

The most common deletions causing α -thalassemia ($-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $--^{MED}$, $-(\alpha)^{20.5}$, $--^{SEA}$) were screened by PCR (13,14,15). The five most frequent non-deletional mutations causing α -thalassemia (α^{HphI} , α^{NcoI} , $\alpha\alpha^{NcoI}$, α^{Ic} and α^{TSaudi}) were investigated with the restriction enzymes HphI, NcoI and Mse I, respectively (3,16,17) and by specific nested PCR (α^{TSaudi}) (18).

RESULTS

Among the seven Hb H disease patients, all of Italian descent, four had the following genotypes: $-(\alpha)^{20.5}/-\alpha^{3.7}$ (two cases), $--^{MED}/-\alpha^{3.7}$ and $--^{MED}/\alpha^{Hph}\alpha$. The other three had an unusual unidentified form of α -thalassemia which seemed to be non-deletional [$-\alpha^{3.7}/(\alpha\alpha)^T$] since both genes were present. No mutation was detected following sequencing from the promoter region to the poly A signal. These results are demonstrated in Table 1.

Among the 27 individuals with structural alterations, 15 (Caucasians of Italian descent) had Hb Hasharon ($\alpha 47 \text{ Asp} \rightarrow \text{His}$), associated with the $-\alpha^{3.7}$ deletion ($-\alpha^{\text{Hasharon}}$): one was homozygous ($-\alpha^{\text{Hasharon}}/-\alpha^{\text{Hasharon}}$) and 14 were heterozygous ($-\alpha^{\text{Hasharon}}/\alpha\alpha$). One of these 14 individuals had a concomitant new β -globin variant, Hb Rio Claro ($\beta 34 \text{ Val} \rightarrow \text{Met}$) (19). Four Caucasian adults (Italian descendants) were heterozygous for Hb J-Rovigo ($\alpha 53 \text{ Ala} \rightarrow \text{Asp}$) and one of them was also a β -thalassemia carrier. Hb Stanleyville-II ($\alpha 78 \text{ Asn} \rightarrow \text{Lys}$) was found in four individuals (3 Blacks and 1 Caucasian, all heterozygous), always in association with the $-\alpha^{3.7}$ deletion ($-\alpha^{\text{Stanleyville}}$). One Black infant, from the north of Brazil, had Hb G-Pest ($\alpha 74 \text{ Asp} \rightarrow \text{Asn}$), a very rare Hb described initially in a Hungarian family (20). One boy of Portuguese descent had Hb Kurosaki ($\alpha 7 \text{ Lys} \rightarrow \text{Glu}$), another very rare Hb described only once in a Japanese woman (21). Hb Westmead ($\alpha 122 \text{ His} \rightarrow \text{Gln}$), a relatively common silent variant in southern China (22,23), was found in a Caucasian adult, Italian descendant. Hb Campinas ($\alpha 26 \text{ Ala} \rightarrow \text{Val}$) was identified in a Caucasian boy whose descent was unknown. This electrophoretically silent variant, not described previously, results from a base substitution at the 26th codon of the α_2 gene (GCG $\rightarrow$ GTG) (unpublished data). These structural alterations are summarized in Table 2.

DISCUSSION

The thalassemic mutations found in four of the seven Hb H disease patients ($\alpha^{3.7}$, $-\text{MED}$, $-(\alpha)^{20.5}$ and $\alpha^{\text{HphI}}\alpha$) are the most frequent in Mediterranean populations: the first three are common deletions which remove 3.7, 18 and 20.5 kb fragments of DNA from the α -globin gene cluster, respectively, and the latter is a common non-deletional form which removes five nucleotides from the consensus sequence of the splicing donor site of IVS-I (3). All of the Hb H disease patients were of Italian descent. In contrast, the remaining three patients showed the association of the $-\alpha^{3.7}$ deletion with an unusual form of α -thalassemia which leaves both α genes intact, but without expression. This situation may result from an alteration in the α -Major Regulatory Element (α -MRE or HS-40), a major positive regulatory region located 40 kb upstream of the ξ_2 -globin gene cap site (24). A few large deletions are known to remove this locus control region and thereby silence the α -globin genes, which remain structurally intact (3).

Among the structural alterations, Hb Hasharon, the most frequent change, and Hb J-Rovigo, are of Italian origin, whereas Hb Stanleyville-II is of African origin and Hb G-Pest was first described in a Hungarian family in 1972 (20). The latter was found here for the first time in the Brazilian population. Hb Kurosaki was initially described in a 70-year-old Japanese woman (21); the case described here is the second to be described in the world and the first one in Brazil. Hb Westmead was discovered in a Chinese female in 1980 (23) and is common in Guangxi, a province in southern China (22). In the case described here, the first in Brazil, the carrier was of Italian descent. Hbs G-Pest, Kurosaki and Westmead were detected in a screening program, but in carriers with ethnic origins different from those of the original descriptions, suggesting *de novo* mutations. Hb Campinas was a novel silent variant encountered in a Caucasian boy of unknown descent.

Clinically and hematologically, Hbs J-Rovigo, G-Pest, Kurosaki, Westmead and Campinas caused no abnormalities, since the carriers were asymptomatic. Hb Hasharon and Hb Stanleyville-II carriers had mild microcytic and hypochromic red blood cells, probably because of the association with α -thalassemia.

The present study represents the largest analysis to-date of individuals with α -globin gene mutations in Brazil. The results confirmed the strong Italian and African influences in the region of Brazil examined, and reflected the intense immigration that took place in the last century and at the beginning of the twentieth century.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Dr. Stephen Hyslop of the Department of Pharmacology, School of Medical Sciences, UNICAMP, for reviewing the language of the manuscript.

REFERENCES

1. Weatherall DJ & Clegg JG (1981). *The Thalassaemia Syndromes*. 3rd edn. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
2. Bunn HF, & Forget BG (1986). *Hemoglobin: Molecular, Genetics and Clinical Aspects*, W. B. Saunders, Philadelphia.
3. Kattamis AC, Camaschella C, Sivera P, Surrey S & Fortina P (1996). Human α -thalassemia syndromes: detection of molecular defects. *American Journal of Hematology*, 53: 81-91.
4. Working Party of the General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology (1998). Guideline. The laboratory diagnosis of haemoglobinopathies. *British Journal Haematology*, 101: 783-792.
5. Zago MA & Costa FF (1985). Hereditary haemoglobin disorders in Brazil. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79: 385-388
6. Sonati MF, Kimura EM, Grotto HZW, Gervásio SA & Costa FF (1996). Hereditary hemoglobinopathies in a population from southeast Brazil. *Hemoglobin*, 20: 175-179.
7. Sonati MF, Farah SB, Ramalho AS & Costa FF (1991). High prevalence of α -thalassemia in a Black population of Brazil. *Hemoglobin*, 15: 309-311.
8. Zago MA, Costa FF & Bottura C (1984). Hemoglobin H disease in three Brazilian families. *Revista Brasileira de Genética*, 7: 137-147.
9. Alter BP, Goff SC, Efremov GD, Gravely ME & Huisman THJ (1980). Globin chain electrophoresis: a new approach to the determination of the $\gamma^G\gamma^A$ ratio of globin synthesis. *British Journal of Haematology*, 44: 527-534.
10. Pembrey ME, MacWade P & Weatherall DJ (1972). Reliable routine estimation of small amounts of foetal haemoglobin by alkali denaturation. *Journal of Clinical Pathology*, 25:738-740.

11. Dacie JV & Lewis SM (1995). *Practical Haematology*, 8th edn, Churchill Livingstone, Edinburgh.
12. Dodé C, Rochette J & Krishnamoorthy R (1990). Locus assignment of human α -mutation by selective amplification and direct sequencing. *British Journal of Haematology*, 76: 275-281.
13. Baysal E & Huisman THJ (1994). Detection of common deletional α -thalassaemia-2 determinants by PCR. *American Journal of Hematology*, 46: 208-213.
14. Bowden DK, Vickers MA & Higgs DR (1992). A PCR-based strategy to detect the common severe determinants of α thalassaemia. *British Journal of Haematology*, 81: 104-108.
15. Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J & Rochette J (1993). Rapid analysis of $-\alpha^{3.7}$ thalassaemia and $\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$ triplication by enzymatic amplification analysis. *British Journal of Haematology*, 82: 105-111.
16. Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Tzetzis M, Kattamis A & Kattamis C (1993). Characterization of nondeletional α thalassaemia mutations in the Greek population. *American Journal of Hematology*, 44: 162-167.
17. Makonkawkeyoon L, Sanguansermisri T, Asato T, Nakashima Y & Takei H (1993). Rapid detection of chain termination mutation in the α_2 globin gene. *Blood*, 82: 3503-3504.
18. Hall GW, Thein SL, Newland CA, Chisholm JTS, Kanavakis E, Kattamis C & Higgs DR (1983). A base substitution (T $\rightarrow$ C) in codon 29 of the α_2 -globin gene causes α thalassaemia. *British Journal of Haematology*, 85: 546-552.
19. Grignoli CRE, Wenning MRSC, Sonati MF, Kimura EM, Arruda VR, Saad STO & Costa FF (1999). Hb Rio Claro $\beta 34$ (B16) Val $\rightarrow$ Met: a novel electrophoretically silent variant found in association with Hb Hasharon $\alpha 47$ (CE5) Asp $\rightarrow$ His and α thalassaemia 2 ($-\alpha^{3.7}$). *Hemoglobin*, 23: 177-182.

20. Brimhall B, Durest M, Hollan SR, Stenzel P, Szelényi J & Jones RT (1974). Structural characterization of hemoglobin J-Buda [$\alpha 61(\text{E}10)$ Lys $\rightarrow$ Asn] and G-Pest [$\alpha 74(\text{EF}3)$ Asp $\rightarrow$ Asn]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 336: 344-360.
21. Harano T, Harano K, Imai K, Murakami T & Matsubara H (1995). Hb Kurosaki [$\alpha 7(\text{A}5)$ Lys $\rightarrow$ Glu]: a new α chain variant found in a Japanese woman. *Hemoglobin*, 19: 197-201.
22. Jiang NH, Liang S, Wen XJ, Liang R, Su C & Tang Z (1991). Hb Westmead: an $\alpha 2$ -globin gene mutation detected by polymerase chain reaction and StuI cleavage. *Hemoglobin*, 15: 291-295.
23. Gu Y-C, Gu L-H, Wilson JB, Cepreganova B, Ramachandran M, Walker ELD & Huisman THL (1991). Hb Westmead [$\alpha 122(\text{H}5)$ His $\rightarrow$ Gln], Hb E [$\beta 26(\text{B}8)$ Glu $\rightarrow$ Lys], and α -thalassemia-2 (3.7 Kb deletion) in a Laotian family. *Hemoglobin*, 15: 297-302.
24. Higgs DR, Wood WG, Jarman AP, Sharpe J, Pretorius IM & Ayyub H (1990). A major positive regulatory region located far upstream of the human α -globin gene locus. *Genes Dev.* 4: 1588-1601.

TABLE 1- HEMATOLOGICAL DATA FOR THE PATIENTS WITH Hb H DISEASE

Carrier	BFB	FP	EFF	TCA	CAB	FAF	FVS
Age (y)	40	44	9	7	16	39	6
RBC ($\times 10^6/\text{ml}$)	5.64	6.0	5.92	4.63	5.02	6.24	4.67
Hb (g/dl)	9.7	12.1	9.0	8.3	9.4	12.6	7.9
Ht (%)	32.5	43	33	29	31	42	26.5
MCV (fl)	58	69.9	55.5	63	62	67	57
MCH (pg)	17.2	19.8	15.2	17.9	18.6	20.1	16.9
Electr.prof. (pH 8.9)	A ₂ +A+H	A ₂ +A+H	A ₂ +A+H+ Bart's	A ₂ +A+H	A ₂ +A+H+ Bart's	A ₂ +A+H	A ₂ +A+H
HbA ₂ (%)	1.0	1.0	1.4	0.7	1.3	1.2	0.9
HbF (%)	1.3	1.0	1.4	0.9	1.0	1.3	1.0
HbH (%) (+Bart's)	4.9	6.1	3.6	26.5	4.5	4.5	14.0
α -Genotype	$-(\alpha)^{205}/-\alpha^{3.7}$	$-(\alpha)^{20.5}/-\alpha^{3.7}$	$--^{MED}/-\alpha^{3.7}$	$--^{MED}/\alpha^{Hb}\alpha$	$-\alpha^{3.7}/\alpha^T\alpha$	$-\alpha^{3.7}/\alpha^T\alpha$	$-\alpha^{3.7}/\alpha^T\alpha$

TABLE 2 - STRUCTURAL ALTERATIONS IN α -GLOBIN GENES

Abnormal Hemoglobin	Hasharon ($\alpha 47 \text{ Asp} \rightarrow \text{His}$)	Stanleyville-II ($\alpha 78 \text{ Asn} \rightarrow \text{Lys}$)	J-Rovigo ($\alpha 53 \text{ Ala} \rightarrow \text{Asp}$)	G-Pest ($\alpha 74 \text{ Asp} \rightarrow \text{Asn}$)	Kurosaki ($\alpha 7 \text{ Lys} \rightarrow \text{Glu}$)	Westnead ($\alpha 122 \text{ His} \rightarrow \text{Gln}$)	Campinas ($\alpha 26 \text{ Ala} \rightarrow \text{Val}$)
No of Individuals	15	4	4	1	1	1	1
Race	Caucasians	3 Blacks + 1 Caucasian	Caucasians	Black	Caucasian	Caucasian	Caucasian
Electr profile (pH 8.9)	A ₂ ¹ , A ₂ , Hash., A	A ₂ ¹ , A ₂ , Stanl., A	A ₂ , A ₁ , J-Rovigo	A ₂ ¹ , A ₂ , G-Pest, A	A ₂ , A ₁ , Kurosaki	A ₂ A	A ₂ A
Globin Electroph.	$\alpha + \alpha^H + \beta$	$\alpha + \beta$	$\alpha + \beta$	$\alpha + \beta$	$\alpha + \alpha^K + \beta$	$\alpha + \beta + \alpha^W$	$\alpha + \alpha^C + \beta$
α -Genotype	$-\alpha^{3.1}/\alpha\alpha$	$-\alpha^{3.1}/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Mutation	$\alpha_1(\text{GAC} \rightarrow \text{CAC})$	$\alpha_1(\text{AAC} \rightarrow \text{AAA})$	$\alpha_2(\text{GCC} \rightarrow \text{GAC})$	$\alpha_2(\text{GAC} \rightarrow \text{AAC})$	$\alpha_1(\text{AAG} \rightarrow \text{GAG})$	$\alpha_2(\text{CAC} \rightarrow \text{CAG})$	$\alpha_2(\text{GCG} \rightarrow \text{GTG})$

CAPÍTULO 2

Molecular Characterization of Hemoglobins Kurosaki ($\alpha 7$ Lys $\rightarrow$ Glu), G-Pest ($\alpha 74$ Asp $\rightarrow$ Asn), Stanleyville-II ($\alpha 78$ Asn $\rightarrow$ Lys) and J-Rovigo($\alpha 53$ Ala $\rightarrow$ Asp)

(*in press* no periódico *Acta Haematologica*)

Approx. printed pages: 2

Note: Underlining of [1], figs. 4 and tabs. 0 will be deleted during pagination

Running title:

Molecular Bases of Hbs Kurosaki, G-Pest,
Stanleyville-II and J-Rovigo

Brief Communication

Acta Haematol

Molecular Characterization of Hemoglobins Kurosaki [$\alpha 7$ Lys $\rightarrow$ Glu], G-Pest [$\alpha 74$ Asp $\rightarrow$ Asn], Stanleyville-II [$\alpha 78$ Asn $\rightarrow$ Lys] and J-Rovigo [$\alpha 53$ Ala $\rightarrow$ Asp]

M.R.S.C. Wenning^a E.M. Kimura^a S.B. Jorge^a F.F. Costa^b M.F. Sonati^a

^aDepartment of Clinical Pathology, ^bDepartment of Clinical Medicine, School of Medical Sciences,
State University of Campinas-UNICAMP, Campinas (SP), Brazil

Received: August 30, 1999
Accepted: September 15, 1999

KARGER

Fax + 41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 1999 S. Karger AG, Basel

0001-5792/.../... \$17.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/journals/aha

Dr. M.F. Sonati

Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences
State University of Campinas-UNICAMP
CP 6111 - CEP 13083-970, Campinas (SP) (Brazil)

Tel. +55 19 788 7064, Fax +55 19 289 3273, E-Mail sonati@fcm.unicamp.br

Although many abnormal hemoglobins (Hbs) do not produce any significant clinical alterations, the elucidation of their structural modifications contributes importantly to the understanding of the structure-function relationship of proteins [1].

The identification of the molecular defects responsible for structural anomalies is a rapid, direct and precise way to know the origin of a modification and also plays an increasing role in studies on human molecular genetics and human disease genes [2].

The present study determined the molecular bases of 4 Hb structural variants, Hbs Kurosaki, G-Pest, Stanleyville-II and J-Rovigo, all of the α -chain, whose alterations ($\alpha 7$ Lys $\rightarrow$ Glu, $\alpha 74$ Asp $\rightarrow$ Asn, $\alpha 78$ Asn $\rightarrow$ Lys and $\alpha 53$ Ala $\rightarrow$ Asp, respectively) were identified only by protein analyses. The variants were screened by electrophoresis on cellulose acetate, at pH 8.9, in agar gel, at pH 6.0 [3], and by globin chain electrophoresis on acrylamide gel at acid pH [4]. DNA samples were isolated from peripheral blood leukocytes by an organic extraction method. The α -globin genes were selectively amplified by the polymerase chain reaction (PCR) according to Dodé et al. [5] and sequenced with the Sequenase Kit, Version 2.0 (United States Biochemical USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA) after single-strand separation with magnetic beads (Dynal Inc., Oslo, Norway) [6]. Mutations were confirmed by sequencing of the opposite strand and familial analyses. α -Thalassemia was investigated by PCR [7, 8].

Hb Kurosaki ($\alpha 7$ Lys $\rightarrow$ Glu) was detected in a Caucasian infant of Portuguese descent and his father. The mutation was located at the 7th codon of the α_1 -gene (AAG $\rightarrow$ GAG) (fig. 1). This variant was first described in a 70-year-old Japanese woman [9]; this is the second description in the world literature.

Hb G-Pest ($\alpha 74$ Asp $\rightarrow$ Asn) was found in a boy, native of northern Brazil. The mutation was detected at the 74th codon of the α_2 -gene (GAC $\rightarrow$ AAC) (fig. 2). This is also an unusual variant which was discovered in 1972 in a Hungarian family [10]; it is described for the first time in the Brazilian population.

Hb Stanleyville-II ($\alpha 78$ Asn $\rightarrow$ Lys) was found in 4 adult individuals, 3 Blacks and 1 Caucasian, always in association with α -thalassemia ($-\alpha^{3.7}$ deletion). The mutation was located at the 78th codon of the hybrid gene (α_2 - α_1) (AAC $\rightarrow$ AAA) (fig. 3). This is a relatively common variant in Black populations [11].

1 A

3

4

120 Hb J-Rovigo ($\alpha 53$ Ala $\rightarrow$ Asp) was detected in 4 Cau-
121 sian adults of Italian descent, 1 of them also a carrier of
122 β -thalassemia. The mutation was found at the 53rd codon
123 of the α_2 -gene (GCC $\rightarrow$ GAC) (fig. 4). This Hb has been
124 encountered in Italians from the province of Rovigo in
125 northern Italy [12].

126 Hbs G-Pest, Kurosaki and J-Rovigo appeared to cause
127 no clinical and hematological abnormalities, and the car-
128 riers were asymptomatic. Some carriers of Hb Stanley-
129 ville-II, showed mild microcytic and hypochromic RBC,
130 probably due to the concomitant presence of α -thalasse-
131 mia.

- 11 Costa FF, Sonati MF, Zago MA: Hb Stanley-ville-II ($\alpha_2 78$ Asn $\rightarrow$ Lys) is associated with a $-\alpha^{3.7kb}$ α -globin gene deletion. Hum Genet 1991;86:319-320.
- 12 Alberti R, Mariuzzi GM, Artibani L, Bruni E, Tentori L: A new haemoglobin variant: J-Rovigo alpha 53 (E-2) alanine $\rightarrow$ aspartic acid. Biochim Biophys Acta 1974;342:1-4.

134 Acknowledgment

135 This work was supported by FAPESP and CNPq/Brazil.

138 References

- 139 1 Bunn HF, Forget BG: Hemoglobin: Molecular,
140 Genetic and Clinical Aspects. Philadelphia,
141 Saunders, 1986.
- 142 2 Cotton RGH: Mutation Detection. Oxford,
143 Oxford University Press, 1997.
- 144 3 Dacie JV, Lewis SM: Practical Haematology,
145 ed 8. London, Churchill Livingstone, 1995.
- 146 4 Alter BP, Goff SC, Efremov GD, Gravely ME,
147 Huisman THJ: Globin chain electrophoresis: A
148 new approach to determination of γ^A/γ^F ratio
149 of globin synthesis. Br J Haematol 1980;44:
150 527-534.
- 151 5 Dodé C, Rochette J, Krishnamoorthy R: Locus
152 assignment of human α -mutations by selective
153 amplification and direct sequencing. Br J Hae-
154 matol 1990;76:275-281.
- 155 6 Thein SL, Hinton J: A single and rapid method
156 of direct sequencing using Dynabeads. Br J
157 Haematol 1991;79:113-115.
- 158 7 Baysal E, Huisman THJ: Detection of com-
159 mon deletion α -thalassemia-2 determinants by
160 PCR. Am J Haematol 1994;46:208-213.
- 161 8 Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochet-
162 te J: Rapid analysis of $-\alpha^{3.7}$ thalassemia and
163 $\alpha\alpha^{ant}$ 3.7 triplication by enzymatic amplifica-
164 tion analysis. Br J Haematol 1992;82:105-
165 111.
- 166 9 Harano T, Harano K, Imai K, Murakami T,
167 Matsubara H: Hb Kurosaki [$\alpha 7$ (A5) Lys $\rightarrow$
168 Glu]: A new α chain variant found in a Japa-
169 nese woman. Hemoglobin 1995;19:197-201.
- 170 10 Brimhall B, Duerst M, Hollan SR, Stenzel P,
171 Szelenyi J, Jones RT: Structural characteri-
172 zation of hemoglobin J-Buda [$\alpha 61$ (E10)
173 Lys $\rightarrow$ Asn] and G-Pest [$\alpha 74$ (EF3) Asp $\rightarrow$ Asn].
174 Biochim Biophys Acta 1974;336:344-360.

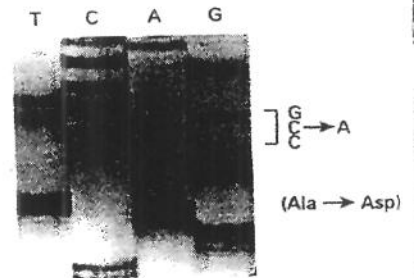
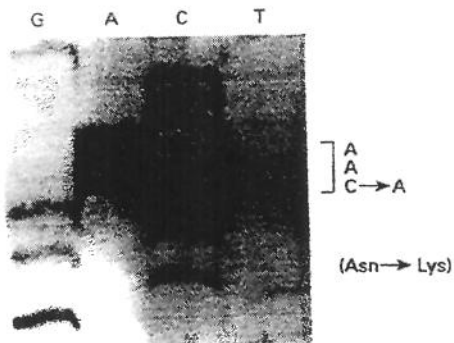
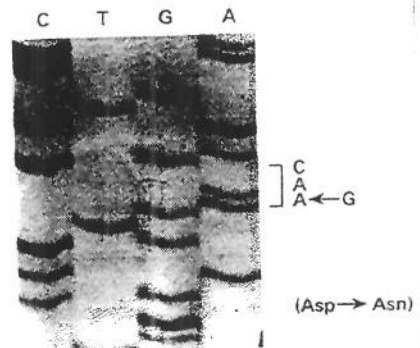
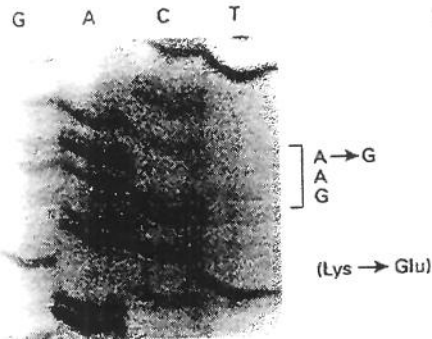
4

Fig. 1. Hb Kurosaki ($\alpha 7$ Lys $\rightarrow$ Glu): direct sequencing of the α_1 -gene, showing the mutation in codon 26 (AAG $\rightarrow$ GAG).

Fig. 2. Hb G-Pest ($\alpha 74$ Asp $\rightarrow$ Asn): direct sequencing of the α_2 -gene, showing the mutation in codon 74 (GAC $\rightarrow$ AAC).

Fig. 3. Hb Stanleyville-II ($\alpha 78$ Asn $\rightarrow$ Lys): direct sequencing of the hybrid gene (α_2 - α_1), showing the mutation in codon 78 (AAC $\rightarrow$ AAA).

Fig. 4. Hb J-Rovigo ($\alpha 53$ Ala $\rightarrow$ Asp): direct sequencing of the α_2 gene, showing the mutation in codon 53 (GCC $\rightarrow$ GAC).



P

CAPÍTULO 3

Hb Campinas [α 26(B7) Ala→Val]]: A Novel Electrophoretically Silent Variant

*(in press no periódico **Hemoglobin**)*

Hb Campinas [α 26(B7)Ala→Val]: a Novel Electrophoretically Silent Variant

**M.R.S.C. Wenning¹, N.M. Silva¹, S.B. Jorge¹, E.M. Kimura¹,
F.F. Costa², M.A. Torsoni³, S.H. Ogo³, M F. Sonati¹**

¹ *Department of Clinical Pathology*

² *Department of Clinical Medicine, School of Medical Sciences*

³ *Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences*

State University of Campinas

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

Alterations in the structure of the hemoglobin (Hb) are quite often caused by point mutations. Many variants are clinically and hematologically silent because the alteration does not affect either the function or the stability of the molecule (1). The Hb structural variants are usually detected by their abnormal electrophoretic mobility; however, a significant proportion is caused by replacements which do not change the electrical charge of the protein (2).

We identified a new, electrophoretically silent, Hb variant in a 9-year-old healthy Caucasian Brazilian boy, which we have named Hb Campinas. It was detected during a screening program for Hb mutations, systematically performed in patients without hematological disease, at the Clinical Pathology Laboratory of the UNICAMP University Hospital, Campinas, State of São Paulo, Southeast Brazil. The analyses were based on cellulose acetate and globin chain electrophoreses. On cellulose acetate at pH 8.9, and in agar gel at pH 6.0 (3), the mobility of the new variant was like Hb A. The globin chain electrophoresis on acrylamide gel at acid pH (4) showed a slower band when compared to the normal α chain (Fig. 1). Hb A₂, spectrophotometrically measured after elution from cellulose acetate strips (3), and Hb F, determined by alkali denaturation (5), were both at normal levels. The stability of Hb Campinas was evaluated by n-butanol, isopropanol and heat stability tests (3), showing

normal results. Heinz bodies were not found. Oxygen affinity tests (6), carried out on Hb and stripped Hb, with and without phosphate, were found to be normal. Table I summarizes the hematological data obtained from the carrier and his mother, who also showed the same Hb alteration.

Molecular analyses to identify the mutation involved the selective amplification of the α -globin genes by polymerase chain reaction (PCR) (7), followed by DNA direct sequencing (8) with Sequenase Kit Version 2.0 [United State Biochemical (USB) Corporation, Cleveland, OH, USA] after single strand separation with magnetic beads (9) (Dynal Inc, Oslo, Norway). α -Thalassemia (thal) was investigated by PCR (10,11). The mutation was confirmed by sequencing the opposite strand.

The results revealed that Hb Campinas is caused by a single base substitution at codon 26 of the $\alpha 2$ -globin gene (GCG→GTG) (Figs. 2 and 3), which replaces the alanine residue by a valine residue in the α chain. This residue is not involved in either the α/β contacts, or in the heme-globin linkage. As expected, the oxygen affinity tests as well as the stability tests, were normal. Both mother and son are clinically and hematologically normal.

This is the third description of mutation in codon 26 of the α -globin chain; the other two previously described variants have either glutamic acid (Hb Shenyang) or threonine (Hb Caserta) instead alanine at this position. The former was found to be slightly unstable, while the latter was normal (12,13).

Acknowledgments. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil, grants 1996/1118-8 and 1997/11725-1, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, grant 520059-6.

REFERENCES

- .1□ Bunn, H.F. and Forget, B.G.: *Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, USA, 1986.
- .2□ Moo-Penn, W.F., Jue, D.L., Johnson, M.H., Bechtel, K.C., and Patchen, L.C.: Hemoglobin variants and methods used for their characterization during 7 years of screening at the Center for Disease Control. *Hemoglobin*, 4:347-361, 1980.
- .3□ Dacie, J.V. and Lewis, S.M.: *Practical Haematology*, 8th edition, Churchill Livingstone, London, England, 1995.
- .4□ Alter, B.P., Goff, S.C., Efremov, G.D., Gravely, M.E., and Huisman, T.H.J.: Globin chain electrophoresis: a new approach to the determination of the G_{γ}/A_{γ} ratio of globin synthesis. *Br. J. Haematol.*, 44:527-534, 1980.

- .5□ Pembrey, M.E., MacWade, P., and Weatherall, D.J.: Reliable routine estimation of small amounts of foetal haemoglobin by alkali denaturation. *J. Clin. Pathol.*, 25:738-740, 1972.
- .6□ Blouquit, Y., Braconnier, F., Cohen-Solal, M., Foldi, J., Arous, N., Ankri, A., Binet, J.L., and Rosa, J.: Hemoglobin Pitie-Salpetriere [β 34 (B16) Val→Phe] a new high oxygen affinity variant associated with familial erythrocytosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 624:473-478, 1980.
- .7□ Dodé, C., Rochette, J., and Krishnamoorthy, R.: Locus assignment of human α globin mutations by selective amplification and direct sequencing. *Br. J. Haematol.*, 76:275-281, 1990.
- .8□ Sanger, F., Nickelen, S., and Coulson, A.R.: DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463-5467, 1977.
- .9□ Thein, S.L. and Hinton, J.: A simple and rapid method of direct sequencing using Dynabeads. *Br. J. Haematol.*, 79:113-115, 1991.
- .10□ Baysal, E. and Huisman, T.H.J.: Detection of common deletion α -thalassaemia-2 determinants by PCR. *Am. J. Haematol.*, 46:208-213, 1994.
- .11□ Dodé, C., Krishnamoorthy, R., Lamb, J., and Rochette, J.: Rapid analysis of $-\alpha^{3.7}$ thalassaemia and $\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$ triplication by enzymatic amplification analysis. *Br. J. Haematol.*, 82: 105-111, 1992.
- .12□ Zeng, Y-T., Huang, S-Z., Zhou, X-D, Qui, X-K, Dong, Q-Y, Li, M-Y, and Bai, J-H.: Hb Shenyang [α 26 (B7) Ala→Glu]: a new unstable variant found in China. *Hemoglobin*, 6: 625-628, 1982.
- .13□ Lacerra, G., De Angioletti, M., Di Girolamo, R., Sciorio, A., Testa, R., Schilirò, G., and Carestia, C.: Hb Caserta and Hb Bronte: two novel hemoglobin variants caused by alpha-2 globin gene mutation. *Abstract 151*, The 6th International Conference on Thalassaemia and the Haemoglobinopathies, Malta, April, 1997.

Received: September 16, 1999. Accepted: December 16, 1999.

Table I. Hematological Data of the Hb Campinas Carrier and His Mother

Parameters	LFL (carrier)	MMOF (mother)
RBC ($10^{12}/L$)	4.73	4.40
Hb (g/dL)	12.8	14.1
PCV (L/L)	0.370	0.400
MCV (fL)	79.4	91.1
MCH (pg)	27.0	32.2
Electrophoretic profile (pH 8.9)	Hb A ₂ +Hb A	Hb A ₂ +Hb A
Agar gel electrophoresis	Hb A	Hb A
Hb A ₂ (%)	2.5	2.1
Hb F (%)	0.86	0.77
Globin chain electrophoresis	$\beta + \alpha^X + \alpha$	$\beta + \alpha^X + \alpha$
Stability tests	normal	normal
Functional tests	normal	normal
α Genotype	$\alpha^X \alpha / \alpha \alpha$	$\alpha^X \alpha / \alpha \alpha$

Chain $\alpha^X = \alpha 26(B7)Ala \rightarrow Val$; gene $\alpha^X = G\underline{C}G \rightarrow G\underline{T}G$.

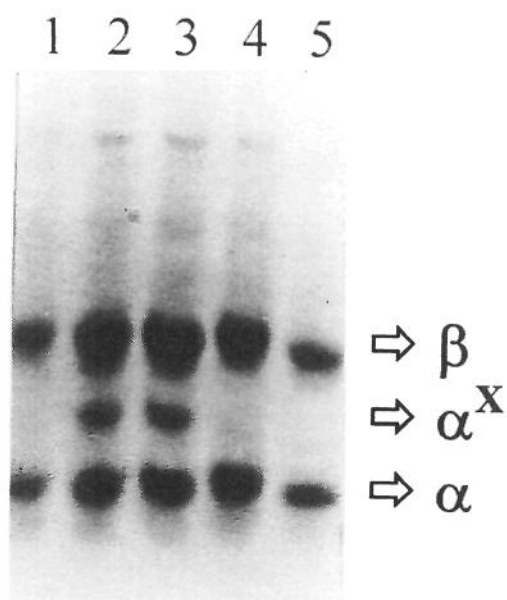


Figure 1. Globin chain electrophoresis on acrylamide gel at acid pH. Lane 1: normal adult control; lane 2: Hb Campinas carrier [$\alpha 26(B7)Ala \rightarrow Val$]; lane 3: carrier's mother; lane 4: carrier's father; lane 5: normal control.

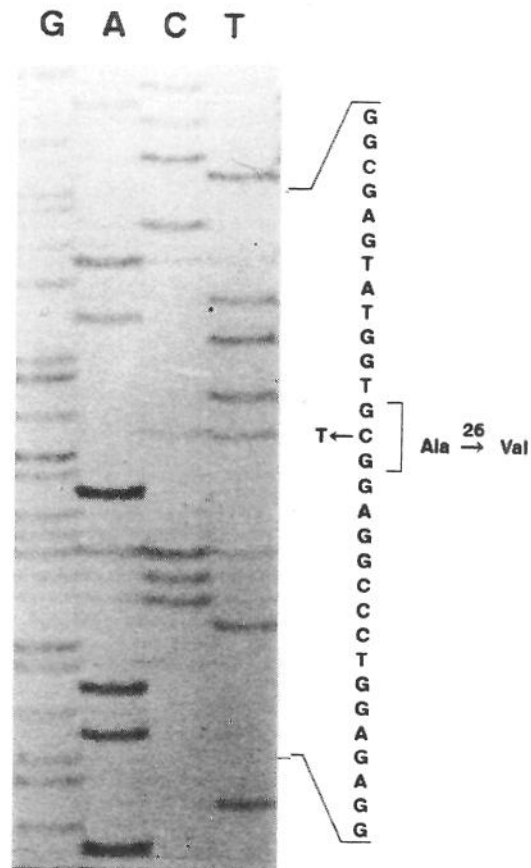


Figure 2. Nucleotide sequence of the $\alpha 2$ -globin gene showing the C→T substitution at codon 26 that is responsible for Hb Campinas.

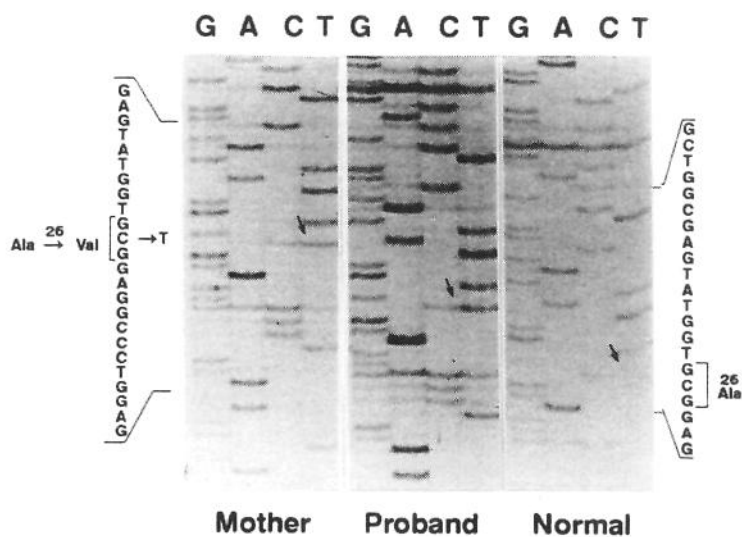


Figure 3. Nucleotide sequence of the $\alpha 2$ -globin gene showing the C→T substitution at codon 26 responsible for Hb Campinas. The arrow indicates the heterozygosity for the mutation in the proband's mother and in the proband, and the corresponding region in a normal control.

CAPÍTULO 4

**Hb Rio Claro [β 34(B16) Val→Met]: A Novel Electroforetically Silent Variant
Found in Association With Hb Hasharon [α 47(CE5) Asp→His] and α
Thalassemia-2 ($-\alpha^{3.7}$)**

(Hemoglobin, 23(2): 177-182, 1999)

SHORT COMMUNICATION

**Hb Rio Claro [β 34(B16)Val $\rightarrow$ Met]:
a Novel Electrophoretically Silent Variant Found in
Association With Hb Hasharon [α 47(CE5)Asp $\rightarrow$ His]
and α -Thalassemia-2 ($-\alpha^{3,7}$)**

C.R.E. Grignoli^{1,2}, M.R.S.C. Wenning³, M.F. Sonati³, E.M. Kimura³,
V.R. Arruda¹, S.T.O. Saad¹, and F.F. Costa¹

¹ Departments of Clinical Medicine;

² Department of Pharmacology;

³ Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas
CP 6111-CEP 13083-970-Campinas SP Brazil

More than 700 hemoglobin (Hb) structural variants have been described. Most of those were originally detected by their abnormal electrophoretic pattern. They may or may not result in clinical manifestations. A significant proportion of these variants is caused by substitutions which do not change the electrical charge of the protein (1).

The present work describes a new electrophoretically silent Hb variant detected by globin chain electrophoresis in a 4-year-old Caucasian Brazilian boy of Italian descent, and in his mother. This new variant has been identified as β 34(B16)Val $\rightarrow$ Met, and was found in association with Hb Hasharon [α 47(CE5)Asp $\rightarrow$ His] and α -thalassemia-2 (α -thal-2) ($-\alpha^{3,7}$, rightward deletion).

Correspondence should be addressed to: Professor Fernando F. Costa, Department of Clinical Medicine, School of Medical Sciences, State University of Campinas-UNICAMP, CP 6111-CEP 13083-970-Campinas, SP, Brazil; TEL: +55-19-788-7866; FAX: +55-19-239-3114; e-mail: ferreira@turing.unicamp.br

Red blood cell indices were determined electronically (Cell Dyn 3.500; Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA, USA). Hb electrophoreses were carried out on cellulose acetate in Tris-EDTA-boric acid buffer at pH 8.9 and on agar gel in sodium citrate buffer at pH 6.1 (2). Hb A₂ was estimated spectrophotometrically after elution from cellulose acetate strips (2). Hb F was determined by alkali denaturation (3). Tests for Hb stability were performed by incubation at 50°C and by the isopropanol test (4). Globin chain electrophoresis was carried out as described by Alter et al (5). Serum iron and total iron-binding capacity were measured to verify the presence of an iron-deficiency anemia.

To identify the Hb variant by DNA analysis, the polymerase chain reaction (PCR) amplified β -globin gene was sequenced with a Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Amersham Lifescience, Inc., Cleveland, OH, USA), using primers described elsewhere (6). The mutation was confirmed by family studies (see Table I). The α -globin genes were also analyzed; the presence of α -thal was investigated using the method described by Baysal and Huisman (7) and, after selective amplification (8) and single stranded DNA separation on

Table I. Hematological Data of the Hb Rio Claro Carrier and His Family

	Carrier	Mother	Father	Sister
Hb (g/dL)	12.3	9.6	16.5	14.8
PCV (L/L)	0.38	0.32	0.47	0.43
RBC ($10^{12}/L$)	5.47	5.36	5.67	5.39
MCV (fL)	70.0	59.0	83.0	80.0
MCH (pg)	22.5	18.0	29.1	27.4
Hb F (%)	0.8	0.6	0.4	0.4
Hb A ₂ (+A ₂ ^{Hasharon}) (%)	1.3	1.3	2.6	2.9
Hb electrophoresis	A ₂ +A ₂ ^{Hasharon} + A+Hasharon	A ₂ +A ₂ ^{Hasharon} + A+Hasharon	A ₂ +A	A ₂ +A
Chain electrophoresis	$\alpha 2 + \alpha 2^{\text{Hasharon}}$ + $\beta + \beta^x$	$\alpha 2 + \alpha 2^{\text{Hasharon}}$ + $\beta + \beta^x$	$\alpha + \beta$	$\alpha + \beta$
Reticulocytes (%)	1.0	1.1	—	—
Ferritin (ng/mL)①	65.0	4.2	—	—
α Genotype	$-\alpha/\alpha\alpha$	$-\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$

① Normal values for males: 30-300; females: 10-200.

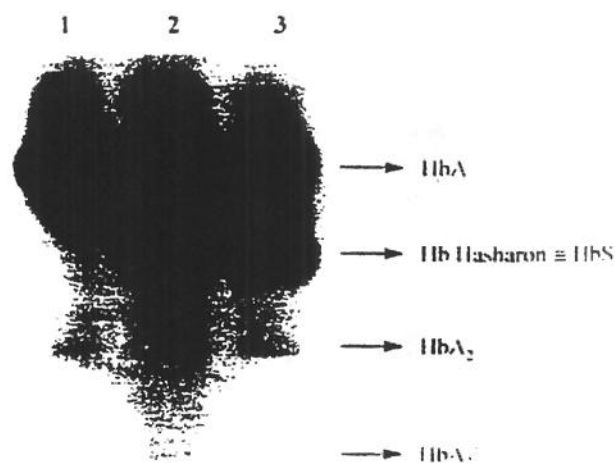


Figure 1. Hb electrophoresis profile in cellulose acetate, TEB buffer, pH 8.6. Lane 1: control; lane 2: Hb Hasharon carrier; lane 3: Hb S heterozygote.

Dynabeads (Dynal Inc., Oslo, Norway) (9), the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes were directly sequenced with the Sequenase kit Version 2.0 [United States Biochemical (USB) Corporation, Cleveland, OH, USA). The α -Hasharon mutation was confirmed by restriction analysis with *TaqI*. The mutation that causes Hb Hasharon is a single base substitution in codon 47 of the α gene. This alteration (*GAC*→*CAC*) removes one of the two *TaqI* recognition sites normally located in this DNA region. Thus, the fragment amplified from normal DNA generated three fragments (495, 190, and 406 bp) when digested with *TaqI* endonuclease, while the amplified DNA from the Hb Hasharon generated two fragments (685 and 406 bp).

The hematological data are shown in Table I. Family studies revealed that the carrier and his mother had the same mutations, while his father and sister were normal.

Cellulose acetate and agar gel electrophoresis showed only the normal Hbs and Hb Hasharon (Fig. 1). However, globin chain electrophoresis revealed that, in addition to the normal bands, there were two other bands which migrated faster than the normal β and α chains (Fig. 2). Analysis of the α -globin gene showed Hb Hasharon and α -thal-2 ($-\alpha^{1,2}$).

β -Globin gene sequencing showed concomitant bands at the first position of codon 34 (*G*→*A*) (Fig. 3) which changed the normal *GTG* to *ATG*, and thus replaced the valine residue by a methionine residue in the protein. This site is involved in $\alpha 1\beta 1$ contact and

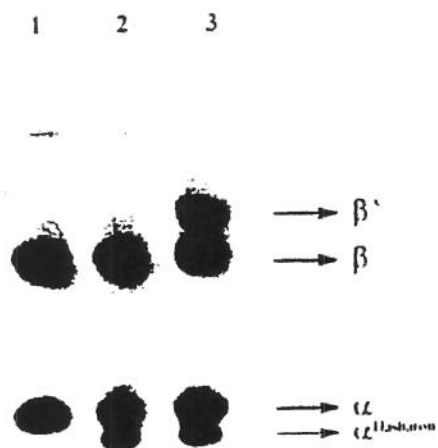


Figure 2. Globin chain electrophoretic profile polyacrylamide gel electrophoresis. Lane 1: normal adult control; lane 2: Hb Hasharon heterozygote [$\alpha 47(\text{CE5})$ Asp $\rightarrow$ His; lane 3: carrier [$\alpha 47(\text{CE5})$ Asp $\rightarrow$ His + $\beta 34(\text{B16})$ Val $\rightarrow$ Met].

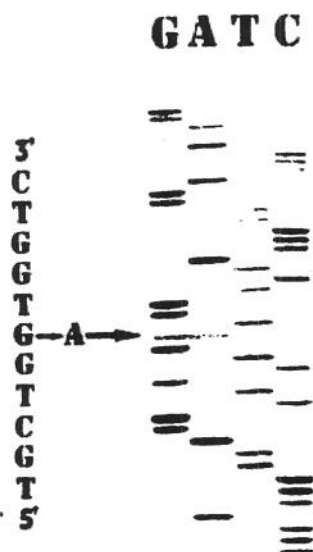


Figure 3. Nucleotide sequence of the PCR-amplified β -globin gene of the Hb Rio Claro carrier. The G $\rightarrow$ A substitution at codon 34 is indicated by the arrow.

mutations in this position could affect the Hb oxygen affinity and/or stability of the molecule (10). However, the Hb stability tests were normal. Hematologically, the carrier had no anemia, and presented only a mild microcytosis and hypochromia, probably resulting from the presence of the α -thal. The mother had moderate microcytic and hypochromic anemia resulting from a concomitant iron deficiency. The only described variant at this position is Hb Pitie-Salpetriere ($\rightarrow$ Phe) and the patient presented high oxygen affinity with erythrocytosis. In Hb Philly, residue 35 is affected, with tyrosine replaced by phenylalanine, which is the same amino acid as in Hb Pitie-Salpetriere. Both Hbs were described as slightly unstable. In the case described here we were not able to detect a Hb instability with a standard procedure. The complex association in the case described here, with the association with Hb Hasharon and α -thal, might contribute to the anemia observed in the patient and his mother.

Acknowledgments. We thank Dr. Stephen Hyslop of the Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, for reviewing the language of the manuscript. This work was supported in part by grants from FAPESP (Fundação de Amparo À pesquisa do Estado de São Paulo: Grant no. 1997/11725-1), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), and Hemocentro-UNICAMP (Brazil).

REFERENCES

1. Moo-Penn, W.F., Jue, D.L., Johnson, M.H., Bechtel, K.C., and Patchen, L.C.: Hemoglobin variants and methods used for their characterization during 7 years of screening at the Center for Disease Control. *Hemoglobin*, 4:347-361, 1980.
2. Weatherall, D.J. and Clegg, J.B.: *The Thalassemia Syndromes*. 3rd edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1981.
3. Pembrey, M.E., MacWade, P., and Weatherall, D.J.: Reliable routine estimation of small amounts of foetal haemoglobin by alkali denaturation. *J. Clin. Pathol.*, 25:738-740, 1972.
4. Dacie, J.V. and Lewis, S.M.: *Practical Haematology*. 8th edition, Churchill Livingstone, London, 1995.
5. Alter, B.P., Goff, S.C., Efremov, G.D., Gravely, M.E., and Huisman, T.H.J.: Globin chain electrophoresis: a new approach to the determination of the $\alpha\gamma/\alpha\beta$ ratio of globin synthesis. *Br. J. Haematol.*, 44:527-534, 1980.
6. Miranda, S.R.P., Kimura, E.M., Saad, S.T.O., and Costa, F.F.: Identification of Hb Zürich [$\alpha_2\beta_263(E7)His\rightarrow Apy$] by DNA analysis in a Brazilian family. *Hemoglobin*, 18:337-341, 1994.
7. Baysal, E. and Huisman, T.H.J.: Detection of common deletion α -thalassemia-2 determinants by PCR. *Am. J. Hematol.*, 46:208-213, 1994.
8. Dodé, C., Rochette, J., and Krishnamoorthy, R.: Locus assignment of human α -globin mutations by selective amplification and direct sequencing. *Br. J. Haematol.*, 76:275-281, 1990.
9. Thein, S.L. and Hinton, J.: A single and rapid method of direct sequencing using Dynabeads. *Br. J. Haematol.*, 79:113-115, 1991.

10. Blouquit, Y., Braconnier, F., Cohen-Solal, M., Földi, J., Arous, N., Ankri, A., Binet, J.L., and Rosa, J.: Hemoglobin Pitie-Salpetriere [$\beta 34(B16)Val \rightarrow Phe$]. A new high oxygen affinity variant associated with familial erythrocytosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 624:473-478, 1980.

Received: August 17, 1998. Accepted: November 11, 1998.

2. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

A talassemia α constitui um grupo de doenças hereditárias, de distribuição mundial, causadas pela deficiência de síntese das cadeias α da hemoglobina. Uma variedade de mecanismos genéticos determinam a produção deficiente dessas cadeias: mutações de ponto em regiões codificantes, mutações nos códigos de iniciação e terminação da cadeia, mutações no sítio de Poli A, nos sítios de *splicing* e deleções em seqüências controladoras. No entanto, são as deleções dos genes α as causas mais comuns da doença, podendo afetar um ou ambos os genes no genoma haplóide, resultando nas talassemias α^+ e α^0 , respectivamente. A doença é amplamente distribuída entre populações do Sudeste Asiático, Oceania, Oriente Médio, Mediterrâneo e África (Kattamis *et al*, 1996). No Continente Americano, há casos descritos nos Estados Unidos, Canadá, México, Jamaica, Colômbia, Peru e Brasil. Neste, poucos estudos foram realizados sobre as diferentes formas de talassemia α e suas freqüências (Echavarria *et al*, 1976; Martinez & Colombo, 1976; Angles *et al*, 1977; Sáenz *et al*, 1979; Colombo *et al*, 1981; Higgs *et al*, 1981; Wong *et al*, 1981; Johnson *et al*, 1982; Zago e cols, 1983 e 1984; Zago & Costa, 1985; Pedrollo e cols, 1988; Costa e cols, 1989; Sonati e cols, 1990; Sonati e cols, 1991; Sonati e cols, 1992; Sonati e cols, 1996).

No presente trabalho foram determinadas as bases moleculares das alterações estruturais e de síntese das cadeias α da hemoglobina presentes em uma população de Campinas e região, no Sudeste Brasileiro. Foram estudados 27 indivíduos distintos com alterações estruturais de cadeias α e 7 pacientes não relacionados com doença da Hb H. Todas essas variantes foram detectadas e estudadas através de métodos eletroforéticos convencionais e testes complementares (solubilidade, estabilidade, pesquisa de corpos de Heinz e de Hb H). As variantes silenciosas foram detectadas na eletroforese de cadeias globínicas, em gel de poliacrilamida, em pH ácido. As mutações responsáveis por essas alterações foram identificadas por análise molecular, que envolveu as técnicas de PCR, análise com enzimas de restrição e o sequenciamento direto de DNA em fase sólida.

Dentre as alterações estruturais encontradas, a mais frequente foi a Hb Hasharon [$\alpha 47$ Asp $\rightarrow$ His (α_1 GAC $\rightarrow$ CAC)], detectada em 15 indivíduos de descendência Italiana (1 homozigoto e 14 heterozigotos). Esta variante é de origem mediterrânea, sendo encontrada em famílias italianas e em judeus da Europa Central ou do Leste Europeu (*Ashkenazi*), e está

associada à talassemia α^+ (deleção $-\alpha^{3.7}$). Tem migração eletroforética semelhante à da Hb S em pH alcalino, migra entre as Hbs S e C em pH ácido, e na eletroforese de globinas, a cadeia α anômala tem migração mais rápida do que a cadeia α normal. Seus portadores não apresentam manifestações clínicas, apenas discretas hipocromia e microcitose, possivelmente devido à talassemia α^+ , uma vez que a hemoglobina anômala, embora considerada discretamente instável, tem comportamento funcional normal devido à posição externa do aminoácido 47 (CE5) (Huisman *et al*, 1998). Isto pôde ser demonstrado pelo homozigoto da variante ($-\alpha^{\text{Hasharon}}/-\alpha^{\text{Hasharon}}$) que, apesar de produzir apenas Hb Hasharon, é completamente assintomático e só foi detectado aos 68 anos de idade, em um programa de triagem para talassemia β em função da hipocromia e microcitose ocasionadas pela talassemia α .

A Hb Hasharon foi seguida das Hbs J-Rovigo [$\alpha 53 \text{ Ala} \rightarrow \text{Asp}$ ($\alpha_2 \text{GCC} \rightarrow \text{GAC}$)], com 4 heterozigotos (todos caucasóides), e Stanleyville-II [$\alpha 78 \text{ Asn} \rightarrow \text{Lis}$ ($\alpha_1 \text{AAC} \rightarrow \text{AAA}$)], detectada em 3 negróides e 1 caucasóide, todos heterozigotos. A primeira foi descrita pela primeira vez em uma família da Província de Rovigo, no Vale do Rio Pô, Norte da Itália (Alberti *et al*, 1974). Tem migração eletroforética mais rápida que a Hb A em pH alcalino e não se separa dela em pH ácido. Na eletroforese de cadeias globínicas, o padrão de migração é normal. Suas propriedades funcionais também são normais (Huisman *et al*, 1998). Os portadores, todos de origem italiana, não apresentam manifestações clínicas ou hematológicas, exceto um dos indivíduos que, concomitantemente, era também portador de talassemia β (hipocromia e microcitose). A Hb J-Rovigo não havia sido previamente caracterizada a nível molecular (Cap. 2).

Com relação à Hb Stanleyville-II, esta é de origem africana e, como a Hb Hasharon, também está associada à deleção $-\alpha^{3.7}$. Esta variante já foi descrita na população brasileira, em associação com a Hb S (Costa e cols, 1987 e 1991). Tem comportamento eletroforético semelhante ao da Hb S em pH alcalino, migra juntamente com a Hb A em pH ácido, e a cadeia anômala não se separa da normal na eletroforese de cadeias globínicas (Huisman *et al*, 1998). Dos 4 indivíduos portadores (3 negróides e 1 caucasóide), nenhum apresentou manifestações clínicas, e as alterações hematológicas observadas (hipocromia e

microcitose), são provavelmente devidas à presença da talassemia α^+ . Este foi também o primeiro estudo a caracterizar molecularmente esta variante (Cap.2).

A Hb G-Pest [$\alpha 74$ Asp→Asn (α_2 GAC→AAC)] foi inicialmente descrita em uma família húngara (Brimhall *et al*, 1974), e pela primeira vez encontrada na população brasileira, em um indivíduo negróide proveniente do norte do país (Pará). A migração eletroforética em pH alcalino é semelhante à da Hb S e, em pH ácido, semelhante à da Hb A (Huisman *et al*, 1998). A eletroforese de cadeias não revela banda anômala. A portadora e seu filho (ambos heterozigotos) não demonstraram manifestações clínicas ou hematológicas, sendo que um outro filho (a óbito com poucos dias de vida), apresentou heterozigose desta variante e, em concomitância, a deleção $-\alpha^{3,7}$, *in trans*. A mutação gênica responsável por esta variante também não havia sido identificada previamente (Cap.2).

Uma criança de 2 meses de idade, de descendência portuguesa, apresentou a Hb Kurosaki [$\alpha 7$ Lis→Glu (α_1 AAG→GAG)], descrita pela primeira vez em 1995 em uma mulher japonesa diabética de 70 anos de idade (Harano *et al*, 1995). Esta é portanto a segunda descrição na literatura e a primeira na população brasileira. A criança e seu pai, também portador, eram clínica e hematologicamente normais, possivelmente devido à posição externa do aminoácido 7 (A5) (Huisman *et al*, 1998). A eletroforese em pH alcalino mostrou uma banda anômala mais rápida que a Hb A, com posição próxima à da Hb H; em pH ácido, migra como a Hb A e a eletroforese de cadeias globínicas revelou que a cadeia anômala tem migração mais lenta que a cadeia α normal. Esta foi a quarta variante estrutural de cadeia α cuja base molecular foi determinada neste estudo (Cap.2).

Um indivíduo de origem italiana apresentou uma variante silenciosa, detectada pela eletroforese de cadeias globínicas, a Hb Westmead [122 His→Gln (α_2 CAC→CAG)]; apesar de relativamente comum no sul da China, onde frequentemente é encontrada em combinação com a talassemia α^+ (Gu *et al*, 1991; Jiang *et al*, 1991), não havia sido previamente descrita na população brasileira. Embora a região $\alpha 122$ esteja envolvida nos contatos $\alpha_1\beta_1$, o que poderia afetar a afinidade pelo oxigênio e a estabilidade da molécula, nenhuma manifestação clínica ou hematológica foi observada nos portadores.

Os casos aqui detectados das Hbs G-Pest, Kurosaki e Westmead representam os primeiros descritos na população brasileira; a origem étnica dos portadores, no entanto, difere dos casos originalmente descritos (húngara, japonesa e chinesa, respectivamente). Embora a população brasileira seja caracterizada por uma elevada heterogeneidade em sua composição racial, nenhum dos portadores aqui investigados relataram possibilidade de miscigenação com as populações acima mencionadas. Associado à raridade destas variantes, este fato sugere que essas alterações sejam mutações *de novo*, hipótese que não pôde ser comprovada pela inviabilidade de um amplo estudo familiar.

Uma nova variante silenciosa de cadeia foi também detectada, denominada Hb Campinas [$\alpha 26$ (B7) Ala→Val (α_2 GCG→GTG)] (Cap.3). Ela foi encontrada em uma criança caucasóide, de 9 anos de idade, sexo masculino, de origem étnica não conhecida, e em sua mãe, ambos clínica e hematologicamente normais. A migração eletroforética nos pHs alcalino e ácido é normal, sendo que, na eletroforese de cadeias globínicas, a cadeia anômala apresenta mobilidade eletroforética menor que a cadeia normal. A posição $\alpha 26$ não está envolvida nas regiões de contato α - β e nem na ligação com o heme, e, como esperado, os testes funcionais e de estabilidade da proteína mostraram-se normais. Duas outras variantes foram descritas anteriormente na posição $\alpha 26$: a Hb Shenyang [$\alpha 26$ (B7) Ala→Glu], detectada em um indivíduo chinês, 23 anos, sexo masculino, cujos testes de estabilidade mostraram uma proteína levemente instável, resultando em anemia em seu portador (Zeng *et al*, 1982), e a Hb Caserta [$\alpha 26$ (B7) Ala→Thr (α_2 GCG→ACG)], encontrada em uma família do sul da Itália, que resulta em fenótipo talassêmico em função da redução do mRNA pela ativação de um sítio crítico de *splicing* nos *codons* 25, 26 e 27 (Lacerra *et al*, 1997).

Com relação aos casos de doença da Hb H analisados neste estudo, foram encontrados os genótipos $-\alpha^{3.7}/--^{MED}$, em um paciente, $-\alpha^{3.7}/-(\alpha)^{20.5}$ em dois outros, e a combinação da deleção $--^{MED}$ com a forma não deletional $\alpha^{HphI}\alpha$ ($-\alpha^{3.7}/\alpha^{HphI}\alpha$), em um quarto paciente. As deleções $--^{MED}$ e $-(\alpha)^{20.5}$ removem fragmentos de 18 e 20.5 Kb de DNA do *cluster* α , respectivamente. A primeira afeta ambos os genes α , e a segunda envolve totalmente o gene α_2 e parcialmente o gene α_1 , que permanece disfuncional. A forma não-

delecional α^{HphI} , como já mencionado, é causada por uma deleção de 5 nucleotídeos no *splicing donor site* do IVS-I do gene α_2 , impedindo o correto processamento do mRNA. Tanto estas deleções quanto a forma não-delecional detectada são freqüentemente encontradas em populações oriundas do Mediterrâneo e são esperadas em pacientes de descendência italiana.

Os outros três pacientes apresentaram a associação da deleção $-\alpha^{3.7}$ com uma forma de talassemia α não-delecional, não identificada, onde ambos os genes α estão presentes, porém aparentemente sem expressão [$-\alpha^{3.7}/(\alpha\alpha)^T$]. Os genes foram sequenciados do sítio "Cap" até o sítio de Poli A, na região 3' não codificante, e nenhuma mutação foi observada. Esses resultados podem ser explicados por possíveis alterações no elemento regulatório dos genes α (α -MRE), já detectadas de forma esporádica em indivíduos de origem portuguesa e italiana (Higgs *et al*, 1990; Romao *et al*, 1991 e 1992). Há várias deleções descritas nesta região e todas elas inativam completamente a expressão dos genes α (Higgs, 1993).

A doença da Hb H manifesta-se com um quadro clínico variável de acordo com a quantidade de Hb H produzida (0,8 - 40%) (Higgs, 1993). Segundo alguns autores, há uma correlação entre o grau de deficiência na produção de cadeias α e a severidade da doença (Traeger-Synodinos *et al*, 1993; Kanavakis *et al*, 1996). A interação entre formas não- delecionais e determinantes α^0 ($\alpha^T\alpha/--$) causam um quadro clínico mais grave, com níveis mais elevados de Hb H do que a combinação entre duas formas delecionais ($-\alpha/--$), provavelmente pelo aumento compensatório na expressão do gene α_1 na presença de deleção adjacente (Liebhaber *et al*, 1985). Determinantes que afetam os genes α_2 ($\alpha^T\alpha/--$), tendem a ser mais severos do que aqueles envolvendo os genes α_1 ($\alpha\alpha^T/--$) (Higgs, 1993), o que está em concordância com a expressão dominante do gene α_2 (Liebhaber *et al*, 1986).

O presente estudo foi o primeiro a investigar sistematicamente e a nível molecular as alterações estruturais e talassêmicas dos genes da globina α em uma população brasileira. Os dados aqui encontrados demonstram uma vez mais a importante contribuição italiana e africana à composição étnica desta região do país. A primeira, oriunda do grande contingente imigratório ocorrido no final do século passado e início deste século, e a

segunda trazida pelos colonizadores portugueses na época do descobrimento. O trabalho também demonstra a existência, na população, de mutações raras ou não previamente descritas, incluindo a possível presença de talassemia α resultante de alterações no elemento regulatório (α -MRE). O conhecimento deste grupo de mutações é de suma importância no esclarecimento individual dos casos, e nos programas de triagem populacional e aconselhamento genético, conforme enfatizado por Romão *et al* (1991 e 1992), quando da detecção destas alterações em indivíduos de origem portuguesa e italiana.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberti, R., Mariuzzi, G.M., Artibani, L., Bruni, E. and Tentori, L. (1974). A new haemoglobin J-Rovigo 53 α (E2) alanine $\rightarrow$ aspartic acid. **Biochim Biophys Acta** **342**: 1-4.
- Alter, B.P., Goff, S.C., Efremov, G.D., Gravely, M.E. and Huisman, T.H.J. (1980). Globin chain electrophoresis: a new approach to the determination of the γ^G/γ^A ratio of globin synthesis. **Br J Haematol** **44**: 527-534.
- Angles Cano, R., Robles Arredondo, I., Ferrer, V., Gonzalez Constandse, R. & Ortiz Trejo, J.F. (1977). Talassemia Alfa (Hemoglobinopatia H) en una Familia Mestiza Mexicana. **Sangre (Barc)** **22(3)**: 366-376.
- Baysal, E. & Huisman, T.H.J. (1994). Detection of Common Deletional α -Thalassemia-2 Determinants by PCR. **Am J Hematol** **46**: 208-213.
- Bradley, T.B., Wohl, R.C. and Smith, G.J. (1975). Elongation of the α -globin chain in a black family: interaction with Hb G-Philadelphia. **Clinical Research** **23**: 1314.
- Brimhall, B., Durest, M., Hollan, S.R., Stenzel, P., Szelényi, J. and Jones, R.T. (1974). Structural characterization of hemoglobin J-Buda [α 61 (E10) Lys $\rightarrow$ Asn] and G-Pest [α 74 (EF3) Asp $\rightarrow$ Asn] **Biochim Biophys Acta** **336**: 344-360.
- Brunak, S., Engelbrecht, J. and Knudsen, S. (1991). Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. **J Mol Biol** **220**: 49-65.
- Bunn, H.F. & Forget, B.G. (1986). **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. Philadelphia, W. B. Saunders Company.
- Chami, B., Liu, B., Garel, M.C. and Galacteros, F. (1994). Quantitation of α and β globin mRNA by competitive PCR reaction. **Br J Haematol** **87**: 59 Suppl.1, (abstract 233).
- Chan, V., Chan, T.K., Liang, S.T., Ghosh, A, Kan, Y.W. and Todd, D. (1985). Hydrops fetalis due to an unusual form of Hb H Disease. **Blood** **66**: 224-228.

- Chang, J.G., Lee, L.S., Lin, C.P., Chen, C.P. and Chen, C.P. (1991). Rapid diagnosis of α -thalassemia-1 of southeast Asia type and hydropsia fetalis by polymerase chain reaction (letter). **Blood** 78: 853-854.
- Clegg, J.B., Weatherall, D.J. and Milner, P.F. (1971). Haemoglobin Constant Spring: a chain termination mutant? **Nature** 234: 337-340.
- Colombo, B. and Martinez, G. (1981). Haemoglobinopathies Including Thalassaemia. Part 2; Tropical America. **Clinics in Haematology** 10: 730-756.
- Costa, F.F., Zago, M.A., Sonati, M.F. and Bottura, C. (1987). The association of the Hb Stanleyville-II with α thalassemia and HbS. **Nouv Ver Fr Hematol** 29: 387.
- 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(3): 605-611.
- Costa, F.F., Sonati, M.F. and Zago, M.A. (1991). Hemoglobin Stanleyville-II (α^{78} Asn $\rightarrow$ Lys) is associated with a 3.7 Kb α -globin gene deletion. **Hum Genet** 86: 319-320.
- Dacie, J.V. & Lewis, S.M. (1995). **Practical Haematology**. 8th edn. Churchill, Livingstone.
- De Jong, W.W.W., Went, L.F., Bernini, L.F. (1975). Hemoglobin Koya Dora: high frequency of a chain termination mutant. **Am J Hum Genet** 27: 81-90.
- Dickerson, R.E. & Gueiss, I. (1983). **Hemoglobin**. London: Benjamin Cummings Publishers.
- Dodé, C., Krishnamoorthy, R., Lamb, J. and Rochette, J. (1993). Rapid analysis of $-\alpha^{3.7}$ thalassaemia and $\alpha\alpha\alpha^{anti\ 3.7}$ triplication by enzymatic amplification analysis. **Br J Haematol** 83: 105-111.
- Di Rienzo, A., Novelletto, A., Aliquo, M.C., Bianco, I., Tagarelli, A., Brancatti, C., Colombo, B. and Felicetti, I. (1986). Molecular Bases for Hb H Disease in Italy: nondeletional Alpha-Thalassemia Haplotypes. **Am J Hum Genet** 39: 631-639.

- Echavarria, R.A., Molina, V.C., & Angel, B.M. (1976). Enfermedad por Hemoglobina H. Tercera Forma de Alfa-Talassemia Encontrada en Colombia. **Sangre (Barc)** 21 (1): 43-53.
- Efremov, G.D., Josifivska, O., Nikolov, F.J., Oner, O., Gonzalez-Redondo, J.M. and Huisman, T.H.J. (1990). Hb Icaria-Hb H disease: identification of the Ib Icaria mutation through analysis of amplified DNA. **Br J Haematol** 75: 250-253.
- Embury, S.H., Miller, J.A., Dozy, A.M., Kan, Y.W., Chan, V. and Todd, D. (1980). Two Different Molecular Organizations Account for the Single α -Thalassemia-2 Genotype. **J Clin Invest** 66: 1319-1325.
- Embury, S.H. (1988). The different Types of α -Thalassemia-2: Genetics Aspects. **Hemoglobin** 12(5&6): 445-453.
- Filtzgerald, M. and Shenk, T. (1981). The Sequence 5'- AAUAAA- 3' Forms Part of the Recognition Site for Polyadenylation of Late SV40 mRNAs. **Cell** 24: 251-260.
- Folayan-Esan, G.J. (1970). The Thalassaemia Syndromes in Nigeria. **Br J Haematol** 19: 47-56.
- Folayan-Esan, G.J. (1972). Haemoglobin Bart's in Newborn Nigerians. **Br J Haematol** 22: 73
- Fritsch, E.F., Lawn, R.M. and Maniatis, T. (1980). Molecular Cloning and Characterization of the Human α -Like Globin Gene Cluster. **Cell** 19: 959-972.
- Fucharoen, S. and Winichagoon, P. (1987). Hemoglobinopathies in Southeast Asia. **Hemoglobin** 11: 65-88.
- Fucharoen, S. & Winichagoon, P. and Thonglairuan, V. (1988). Beta-Thalassemia Associated with Alpha-Thalassemia in Thailand. **Hemoglobin** 12 :581-592.
- Galanello, R., Maccioni, L., Ruggeri, R., Perseu, L and Cao, A. (1984). Alpha Thalassaemia in Sardinian Newborns. **Br J Haematol** 58: 361-368.

- Giordano, P.C. (1998). Hemoglobinopathiën in Nederland: Diagnostiek, epidemiologie en preventie. **Tese de doutorado**.
- Goossens, M., Lee, K.Y., Liebhaber, S.A. and Kan, Y.W. (1982). Globin structural mutant $\alpha 125$ Leu leads to Pro is a novel cause of α -thalassaemia. **Nature** **296**: 864-865.
- Guanti, G., Lonoce, A., Pietrapertosa, A., Polimeno, G. and Tannoia, N. (1983). Alpha-Thalassaemia in Apulia: Biosynthetic Studies. **J Med Genet** **20**: 206-209.
- Gu, Y-C, Gu, L-H, Wilson, J.B., Cepreganova, B., Ramachandran, M., Walker, E.L.D. and Huisman, T.H.L. (1991). Hb Westmead [$\alpha 122$ (H5) His $\rightarrow$ Gln], Hb E [$\beta 26$ (B8) Glu $\rightarrow$ Lys], and α -thalassemia-2 (3.7 Kb deletion) in a Laotian family. **Hemoglobin** **15**: 297-302.
- Harano, T., Harano, K., Imai, K., Murakami, T. and Matsubara, H. (1995). Hb Kurosaki [$\alpha 7$ (A5) Lys $\rightarrow$ Glu]: a new α chain variant found in a Japanese Woman. **Hemoglobin** **19**: 197-201.
- Harteveld, C.L., Losekoot, M., Haak, H., Heister, J.G.A.M., Giordano, P.C. and Bernini, L.F. (1994). A novel polyadenylation signal mutation in the α_2 -globin gene causing α thalassaemia. **Br J Haematol** **87**: 139-143.
- Harteveld, C.L., Losekoot, M., Heister, J.G.A.M., Giordano, P.C., Batelaan, D., Delft, P.V., Haak, H.L., Wijermans, P.W., Losekoot, M. and Bernini, L.F. (1996). An IVS1 - 116 (A $\rightarrow$ G) acceptor splice site mutation in the α_2 -globin gene causing α^+ thalassaemia in two Dutch families. **Br J Haematol** **95**: 461-466.
- Harteveld, C.L., Losekoot, M., Heister, J.G.A.M., Wielen, M., Giordano, P.C. and Bernini, L.F. (1997). α Thalassaemia in The Netherlands: a heterogeneous of both deletions and point mutations. **Hum Genet** **100**: 465-471.
- Harteveld C.L. (1997). The Molecular Genetics of α Thalassaemia: Structure and expression of the α -globin gene cluster. **Tese de doutorado**.

- Hatton, C.S.R., Wilkie, A.O.M., Drysdale, H.C., Wood W.G., Vickers, M.A., Sharpe, J., Ayyub, H., Pretorius, I.M., Buckle, V.J. and Higgs, D.R. (1990). α Thalassemia Caused by a Large (62Kb) Deletion Upstream of the Human α Globin Gene Cluster. **Blood** 76: 221-227.
- Henni, T., Bachir, D., Tabone, P., Jurdic, P., Godet, J. and Colonna, P. (1981). Hemoglobin Bart's in Northern Algeria. **Acta Haematol** 65: 240-246.
- Henni, T., Morlé, F., Lopez, B., Colonna, P. and Godet, J. (1987). Alpha-Thalassemia Haplotypes in the Algerian Population. **Hum Genet** 75: 272-276.
- Higgs, D.R., Pressley, L., Serjeant, G.R., Clegg, J.B. and Weatherall, D.J. (1981). The Genetics and Molecular Basis of Alpha-Thalassemia in Association with Hb S in Jamaican Negroes. **Br J Haematol** 47: 43-56.
- Higgs, D.R., Hill, A.V.S., Bowden, D.K., Weatherall, D.J. and Clegg, J.B. (1984). Independent recombination events between the duplicated human α -globin genes; implications for their concerted evolution. **Nucleic Acids Research** 12: 6965-6977.
- Higgs, D.R., Vickers, M.A., Wikie, A.O.M., Petrorius, I.-M., Jarman, A.P. and Weatherall, D.J. (1989). A Review of the Molecular Genetics of the Human α -Globin Gene Cluster. **Blood** 73: 1081-1104.
- Higgs, D. R., Wood, W.G., Jarman, A. P., Sharpe, J., Pretorius, I. M. and Ayyub, H. (1990). A major positive regulatory region located far upstream of the human α -globin gene locus. **Genes Dev** 4: 1588-1601.
- Higgs, D. R. (1993). The haemoglobinopathies. **Baillieres Clin Haematol** 6:117-150
- Hill, A.V.S., Bowden, D.K., Trent, R.J., Higgs, D.R., Oppenheimer, S.J., Thein, S.L., Mickleson, K.N.P., Weatherall, D.J. and Clegg, J.B. (1985). Melanesians and Polynesians Share a Unique Alpha-Thalassemia Mutation. **Am J Hum Genet** 37: 571-580.

- Hoffbrand, A.V. and Pettit, J.E. (1995). **Essencial Haematology**. 3rd edition, London, Edinburgh, Boston, Blackwell Scientific Publications.
- Honnig, G.R., Shamsuddin, M., Vida, L.N., Mompont, M., Valcourt, E., Bowie, L.J., Jones, E.C., Powers, P.A., Spritz, R.A., Guis, M., Embury, S.H., Conboy, J., Kan, Y.W., Mentzer, W.C., Weil, S.C., Hirata, R.K., Waloch, J., O'Riordan, J.F. and Goldstick, T. (1984). Hemoglobin Evaston ($\alpha 14$ Trp $\rightarrow$ Arg). An Unstable α -Chain Variant Expressed as α -Thalassemia. **J Clin Invest** **73**: 1740-1749.
- Huisman, T.H.J., Caver, M.F.H. and Efremov, G.D. (1998). **A Syllabus of Human Hemoglobin Variants**. 2nd edition. The Sickle Cell Anemia Foundation, Augusta, GA, USA.
- Hundrieser, J., Laig, M., Yongvanit, P., Sriboonlue, P., Sanguansermisri, T., Kuhnau, W., Pape, M. and Flatz, G. (1990). Study of Alpha-Thalassemia in Northeastern Thailand at the DNA Level. **Hum Hered** **40**: 85-88.
- Hunt, D.M., Higgs, D.R., Winichagoon, P., Clegg, J.B. and Weatherall, D.J. (1982). Haemoglobin Constant Spring has an unstable α chain messenger RNA. **Br J Haematol** **51**: 405-413.
- Jiang, N.H., Liang, R., Su, C. and Tang, Z. (1991). Hb Westmead: na $\alpha 2$ -globin gene mutation detected by polymerase chain reaction and Stu I cleavage. **Hemoglobin** **15**: 291-295.
- Johnson, C.S., Constantine, T. and Beutler, E. (1982). Alpha-Thalassemia. Prevalence and Hematologic Findings in American Blacks. **Arch Intern Med** **142**: 1280-1283.
- Kanavakis, E., Tzotzos, S., Liapaki, A., Metaxotou-Mavromati, A. and Kattamis, A. (1986). Frequency of Alpha-Thalassemia in Greece. **Am J Hematol** **22**: 225-232.

- Kanavakis, E., Trager-Synodinos, J.M., Papasotiriou, I., Vrettou, C., Metaxotou-Mavromati, A., Stamoulakatou, A., Lagona, E. and Kattamis, C. (1996). The interaction of α^0 thalassaemia with Hb Icaria; three unusual cases of haemoglobinopathy H. **Br J Haematol** **92**: 332-335.
- Kattamis A.C., Camaschella, C., Sivera, P., Surrey, S. and Fortina, P. (1996). Human α -Thalassemia Syndromes: Detection of Molecular Defects. **Am J Hematol** **53**: 81-91.
- Kulosik, A.E., Kar, B.C., Serjeant, B.E. and Weatherall, D.J. (1988). The molecular basis of α thalassemia in India .Its interaction with the sickle cell gene. **Blood** **71**: 467-472.
- Lacerra, G., De Angioletti, M., Di Girolamo, R., Sciorio, ., Testa, R., Schilirò, G. and Carestia, C. (1997). Hb Caserta and Hb Bronte: two novel hemoglobin variants caused by alpha-2 globin gene mutation. **Abstract 151, The 6th International Conference on thalassaemia and the haemoglobinopathies, Malta, april, 1997.**
- Lauer, J., Shen, C.J. and Maniatis, T. (1980). The Chromosomal Arrangement of Human $\square$ -Like Globin Genes: Sequence Homology and α -Globin Gene Deletions. **Cell** **20**: 119-130.
- Liebhaber, S.A., Cash, F.E. and Ballas, S.K. (1986). Human α -Globin Gene Expression. The Dominant Role of the $\square$ 2-Locus in mRNA and Protein Synthesis. **J Biol Chem** **261**: 15327-15333.
- Liebhaber, S.A., Cash, F.E. and Main, M.D. (1985). Compensatory increase in α_1 -globin gene expression in individuals heterozygous for the α -thalassaemia-2 deletion. **J Clin Invest** **76**: 1057-1064.
- Liebhaber, S.A. (1989). α -Thalassemia. **Hemoglobin** **13(7&8)**: 685-731.
- Martinez, G. & Colombo, B. (1976). Alpha-Thalassaemia in Cuba. **Acta Haematol** **55**: 36-39.
- Mathew, C.G.P., Rousseau, J., Rees, J.S. and Harley, E.H. (1983). The molecular basis of alpha thalassaemia in a South African population. **Br J Haematol** **55**: 103-111.

- Michelson, A. and Orkins, S.H. (1983). Boundaries of Gene Conversion within the Duplicated Human α -Globin Genes. Concerted Evolution by Segmental Recombination. **J Biol Chem** **258** (24): 15245-15254.
- Molchanova, T.P., Pobedinskaya, D.D., & Huisman, T.J. (1994). The differences in quantities of α_2 -and α_1 -globin gene variants in heterozygotes. **Br J Haematol** **88**: 300-306.
- Moi, P., Cash, F.E., Liebhaber, S.A., Cao, A. and Pirastu, M. (1987). An Initiation Codon Mutation (AUG $\rightarrow$ GUG) of the Human $\alpha 1$ -Globin Gene. Structural Characterization and Evidence for a Mild Phenotype. **J Clin Invest** **80**: 1416-1421.
- Moo-Penn, W.F., Jue, D.L., Johnson, M.H., Bechtel, K.C. and 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**: 347-361.
- Na-Nakon, S. & Wasi, p. (1970). Alpha-Thalassemia in Northern Thailand. **Am J Hum Genet** **22**: 645-651.
- Nicholls, R.D., Higgs, D.R., Clegg, J.B. and Weatherall, D.J. (1985). α^0 Thalassemia Due to Recombination Between the $\alpha 1$ -Globin Gene and an *Alu* I Repeat. **Blood** **65**: 1434-1438.
- Nhonoli, A.M., Kojwalile, J.M., Mmari, P.W. and Shemaghoda, Y. (1979). Haemoglobin Bart's in Newborn Tanzanians. **Acta Haematol** **61**: 114-119.
- Novelletto, A., Hafez, M., Di Rienzo, A., Felicetti, L., Ddeidda, G., El Morsi, Z., Al-Tonbary, Y., El-Ziny, M., Abd-El-Gelil, N. and Terrenato, L. (1989). Frequency and Molecular Types of Deletional Alpha-Thalassemia in Egypt. **Hum Genet** **8**: 211-213.
- Olivieri, N.F., Chang, L.S., Poon, A.O., Michelson, M.,A. and Orkin S.H. (1987). An α -globin gene initiation codon mutation in a black family with Hb H disease. **Blood** **70**: 729-732.
- Orkin, S.H. (1978). The duplicated human α globin genes lie close together in cellular DNA. **Proc Natl Acad Sci USA** **75**: 5950-5954.

- Orkin, S.H. and Michelson, A. (1980). Partial deletion of the α -globin structural gene in human α -thalassaemia. **Nature** **286**: 538-540.
- Orkin, S.H., Goff, S.C. and Hechtman R.L. (1981). Mutation in an intervening sequence splice junction in man. **Proc Natl Acad Sci USA** **78**: 5041-5045.
- Ozsoylu, S. and Malik, S.A. (1982). Incidence of Alpha-Thalassemia in Turkey. **Turk J Pediatr** **24(4)**: 235-244.
- Paglietti, E., Galanello, R., Moi, P., Pirastu, M and Cao, A. (1986). Molecular pathology of haemoglobin H disease in Sardinians. **Br J Haematol** **63**: 485-496
- Pauling, L., Itano, H., Singer, S.J. and Wells, I.C. (1949). Sickle cell anemia: A molecular disease. **Science** **110**: 543-548.
- Pedrollo, E., Hutz, M.H., Salzano, F.M. and Timm, A.R. (1988). Detecção de Hemoglobina Bart's e Frequência de Talassemia Alfa em uma população de Neonatos de Porto Alegre. **Ciência e Cultura** **40 (supl)**: 810.
- Pembrey, M.E., Weatherall, D.J., Clegg, J.B., Bunch, C. and Perrine, R.P. (1975). Haemoglobin Bart's in Saudi Arabia. **Br J Haematol** **29**: 221-225.
- Pirastu, M., Saglio, G., Chang, J.C., Cao, A. and Kan, Y.W. (1984). Initiation codon mutation as a cause of α thalassemia. **J Biol Chem** **259**: 12315-12317.
- Piliszek, T.S. (1979). Hb Bart's and its Significance in the South Africa Negro. **Acta Haematol** **61**: 33-38.
- Pressley, L., Higgs, D.R., Metaxatou-Mavromati, A., Clegg, J.B. and Weatherall, D.J. (1980). Characterisation of a new α thalassemia-1 defect due to a partial deletion of the α globin gene complex. **Nucleic Acids Research** **8 (21)**: 4889-4898.
- Pressley, L., Higgs, D.R., Clegg, J.B. and Weatherall, D.J. (1980). Gene deletions in α thalassemia prove that the 5' ζ locus is functional. **Proc Natl Acad Sci USA** **77 (6)**: 3586-3589.

- Proudfoot, N.J. and Maniatis, T. (1980). The Structure of a Human α -Globin Pseudogene and Its Relationship to α -Globin Gene Duplication. **Cell** **21**: 537-544.
- Randhawa, Z.I., Jones, R.T. and Lie-Injo, L.E. (1984). Human Hemoglobin Portland II ($\zeta_2\beta_2$). Isolation and Characterization of Portland Hemoglobin Components and Their Constituent Globin Chain. **J Biol Chem** **259**(11): 7325-7330.
- Rochette, J., Craig, J.E. and Thein, S.L. (1994). Fetal Hemoglobin Levels in Adult. **Blood** **8**: 213-224.
- Romao, L., Osorio-Almeida, L., Higgs, D.R., Lavinha, J. and Liebhaber, S.A. (1991). α -Thalassemia Resulting From Deletion of Regulatory Sequences Far Upstream of the α -Globin Structural Genes. **Blood** **78** (6): 1589-1595.
- Romao, L., Cash, F., Weiss, I., Liebhaber, S., Pirastu, M., Galanello, R., Loi, A., Paglietti, E., Ioannou, P. and Cao, A. (1992). Human α -globin gene expression is silenced by terminal truncation of chromosome 16p beginning immediately 3' of the ζ -globin gene. **Hum Genet** **89**: 323-328.
- Rousseau, J., Mathew, C.G.P., Rees, J.S., Du Toit, E., Botha, M.C. and Harley, E.H. (1985). **Acta Haematol** **73**: 159-162.
- Sáenz, G.F., Jimenez, E. and Mora, L. (1979). Enfermedad por Hemoglobina H en Costa Rica. **Sangre (Barc)** **24** (3): 333-339.
- Sawada, I. and Schmid, C.W. (1986). Primate Evolution of the α -Globin Gene Cluster and Its *Alu*-like Repeats. **J Mol Biol** **192**: 693-709.
- Shakin, S.H. and Liebhaber, S.A. (1986). Translational profiles α_1 - α_2 -, and β -globin messenger ribonucleic acids in human reticulocytes. **J Clin Invest** **78**: 1125-1129.
- Smetanina, N.S., Leonova, J.Y., Levi, N. and Huisman, T.H. (1996). The alpha/beta and alpha 2/ alpha 1-globin mRNA ratios in different forms of alpha-thalassemia. **Biochim Biophys Acta** **1315** (3): 188-192.

- Sonati, M.F. & Costa, F.F. (1990). Hemoglobin Bart's in a Brazilian Black Population. **Brazilian J Med Biol Res 23**: 395-396.
- Sonati, M.F., Farah, S.B., Ramalho, A.S. and Costa, F.F. (1991). High Prevalence of α -Thalassemia in a Black Population of Brazil. **Hemoglobin 15(4)**: 309-311.
- Sonati, M. F., Kimura, E. M., Grotto, H. Z. W., Tavella, M. H. and Costa, F. F. (1992). Hb H Disease Associated With the ($-\text{MED}$) Deletion in a Brazilian Black Woman. **Acta Hematol 87**: 145-147.
- Sonati, M. F., Kimura, E. M., Grotto, H. Z. W., Gervásio, S. A. and Costa, F. F. (1996). Hereditary Hemoglobinopathies in a Population from Southeast Brazilian. **Hemoglobin 20**: 175-179.
- Stammatoyannopoulos, G., Nienhuis, A.W., Majerus, P.W. and Varmus, H. (1994). **The Molecular bases of blood diseases**, 2nd edition. Saunders Company, Philadelphia.
- Thein, S.L., Wallace, R.B., Pressley, L., Clegg, J.B., Weatherall, D.J. and Higgs, D.R. (1988). The Polyadenylation Site in the α -Globin Gene Cluster. **Blood 71**: 313-319.
- Traeger-Synodinos, J., Kanavakis, E., Tzetzis, M., Kattamis, A. and Kattamis, C. (1993). Characterization of Nondeletion α -Thalassemia Mutations in the Greek Population. **Am J Hematol 44**: 162-167.
- Velati, C., Sampietro, M., Sciariada. L., Allievi, E., Mosconi, L., Cappellini, M.D. and Fiorelli, G. (1983). Neonatal Screening for Hb Bart's in Italian Subjects of Heterogeneous Regional Origin Born in Lombardy. **Haematol (Pavia) 68** : 20-29.
- Waye, J.S., Eng, B., Patterson, M., Chui, D.H.K. and Olivieri, N.F. (1994). Identification of novel termination codon mutation (TAA $\rightarrow$ TAT, Term $\rightarrow$ Tyr) in the α_2 -globin gene of a Laotian girl with hemoglobin H disease. **Blood 83**: 3418-3420.
- Weatherall, D.J. & Clegg, J.G. (1981). **The Thalassaemia Syndromes**. 3rd edn. Oxford, Blackwell Scientific Publications.

- Williams, W.J., Beutler, E., Erslev, A.J. and Lichtman, M.A. (1990). **Hematology**, 4th edition. Mc Graw-Hill, Inc., New York.
- Williamson, D. (1993). The Unstable Haemoglobins. **Blood** 7: 146-163.
- Winichagoon, P., Thonglairum, V., Fucharoen, S., Thanphaichito, V.S. and Wasi, P. (1988). Alpha-Thalassemia in Thailand. **Hemoglobin** 12(5&6): 485-498.
- Wong, S.C., Ali, M.A.M. and Boyadjian, S.E. (1981). Sick Cell Traits in Canada. Trimodal Distribution of Hb S as a Result of Interaction with Alpha-Thalassaemia Gene. **Acta Haematol** 65: 157-163.
- Wu, G.Y., Wang, S.W., Zhang, J.W. and Wang, L.M. (1988). The Incidence of Alpha-Thalassemia in South China. **Hemoglobin** 12 (5&6): 529-532.
- Yüregir, G.T., Aksoy, K., Çürük, M.A., Dikmen, N., Fei, Y.-J., Baysal, E. and Huisman, T.H. (1992). Hb H disease in a Turkish family resulting from the interaction of a deletional α -thalassaemia-1 and a newly discovered poly A mutation. **Br J Haematol** 80: 527-532.
- Zago, M.A., & Costa, F.F. (1985). Hereditary Haemoglobin Disorders in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 79: 385-388.
- Zago, M.A., & Costa, F.F. and Bottura, C. (1984). Hemoglobin H Disease in Three Brazilian Families. **Rev Brasil Genet** VII (1): 137-147.
- Zago, M.A., & Costa, F.F., Tone, L.G. and Bottura, C. (1983). Hereditary Hemoglobin Disorders in a Brazilian Population. **Hum Hered** 33: 125-129.
- Zeng, Y.T., Huang, S.Z., Zhou, X-D, Qui, X-K, Dong, Q-Y, Li, M-Y, and Bai, J-H. (1982). Hb Shenyang [α 26 (B7) Ala $\rightarrow$ Glu]: a new unstable variant found in China. **Hemoglobin** 6: 625-628.
- Zeng, Y.T., Huang, S.Z. and Chen, M.J. (1988). The Types and Distribution of Alpha-Thalassemia-2 in China. **Hemoglobin** 12 (5&6): 455-458.

Zhao, J.B., Zhao, L., Fei, Y.J., Liu, J.C. and Huisman, T.H. (1991). A novel α -thalassemia-2 (-2.7Kb) observed in a Chinese patient with Hb H disease. **Am J Hematol** **38**: 248-249.