

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/18708

DOUTORADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1993



Tese de Doutorado
apresentada para
defesa pública
no curso de Ciências
Biológicas - Genética

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
.....CARMEN SÍLVIA BERTUZZO.....
.....MARTINS.....
e aprovada pela Comissão Julgadora.

12/1/93

CARMEN SÍLVIA BERTUZZO MARTINS

Depto. de Genética Médica

FCM - UNICAMP

Caracterização Molecular

de heterozigotos

da Talassemia

Beta

Orientador: Prof. Dr. FERNANDO FERREIRA COSTA

Depto. de clínica Médica

FCM-UNICAMP

1993

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	06
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
T.	18.708
P.	26.1.93
C.	<input type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/>
P. D.	G\$ 100.000,00
DATA	09/02/93
N.º CPU	

CM-00037535-5

Agradecimento especial

Aos Professores Fernando Ferreira Costa e Antonio Sérgio
Ramalho, por terem aberto o caminho das hemoglobinas
para mim.

Dedico esse trabalho aos meus filhos Felipe e Rodrigo,
que durante esses anos dividiram a mãe com a ciência.

AGRADECIMENTOS

Aos professores:

Prof..Dr.Antonio Sérgio Ramalho, pelo contínuo incentivo,

Profa.Dra.Solange Bento Farah, pela ajuda incansável,

Profa. Dra.Christine Hackel, pelo ajuda e apoio,

Profa.Dra. Denise Norato, pela estatística e amizade,

Prof.Dr. Walter Pinto Jr., pelo entusiasmo e confiança,

Prof.Dr. Luis Alberto Magna, pelo apoio,

Prof.Dr. Bernardo Beiguelman, pelas sugestões,

Profa.Dra. Denise cavalcanti, pela amizade

Aos amigos da Genética:

Paulinho e Roberto pelo apoio e amizade irrestrita, Edilisa, Madalena pela ajuda no dia a dia do laboratório. Claudinha, Carlos, Henry, Jô, Sônia, Toninho, Erica, Nilma pela amizade e companheirismo.

Aos amigos da Hematologia:

Sílvia, Mônica, Patrícia, Maria Helena, Tereza, Simone, Dil pela ajuda e momentos agradáveis que passamos juntos. A dupla Marilda e Valder, especiais, que foram o apoio nas horas difíceis e a alegria nas horas de triunfo.

Não seria possível enumerar todas as pessoas que gostaria de agradecer, mas gostaria que todos aqueles que colaboraram de maneira direta ou indireta nesse trabalho soubessem que têm minha gratidão.

ÍNDICE

I-INTRODUÇÃO.....	06
-aspectos clínicos.....	07
-aspectos moleculares.....	11
-O gene da globina beta.....	14
-mutações que dão origem às talassemias beta.....	18
II-OBJETIVOS.....	26
III-CASUÍSTICA e MÉTODOS.....	28
IV-RESULTADOS.....	38
V-DISCUSSÃO.....	48
VI-CONCLUSÃO.....	60
BIBLIOGRAFIA.....	62
ANEXO.....	70

I - INTRODUÇÃO

-aspectos clínicos

As Síndromes Talassêmicas Beta representam um grupo heterogêneo de alterações genéticas caracterizadas pela supressão total (alelos β^0) ou parcial (alelos β^+) da síntese das cadeias beta da hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$). Essas alterações foram introduzidas em nosso país sobretudo pelos maciços contingentes imigratórios Italianos que vieram para o Sul e Sudeste Brasileiros a partir da segunda metade do século passado.

Na população caucasóide paulista, a frequência de heterozigotos da beta talassemia foi estimada em 1% (Ramalho, 1976; Zago et al., 1981). Já entre paulistas descendentes não miscigenados de Italianos essa frequência aumenta para cerca de 6.4% (Ramalho, 1976). É importante ressaltar que em nosso meio a forma mais frequente da talassemia é a β^0 , na qual a síntese da globina beta está totalmente suprimida (Zago et al., 1981).

Do ponto de vista clínico, a talassemia beta pode ser genericamente classificada em três formas: maior, intermediária e menor. Os doentes com talassemia maior ou anemia de Cooley apresentam anemia hemolítica grave e são portadores de dois alelos talassemicos, necessitando de transfusões sanguíneas a intervalos regulares para sobreviverem. Os heterozigotos da talassemia β apresentam, em geral, apenas discreta anemia que não determina manifestações clínicas relevantes. Entre esses limites extremos, ocorrem formas de interações gênicas associadas a quadros clínicos não tão graves quando comparados à forma homozigótica clássica, denominadas genericamente de "talassemia inter-

mediária", na qual os pacientes geralmente não necessitam de transfusões sanguíneas regulares.

Os pacientes com talassemia maior ou anemia de Cooley manifestam alterações clínicas decorrentes de anemia hemolítica grave, com repercussão acentuada sobre o crescimento e o desenvolvimento, esplenomegalia, hepatomegalia e alterações ósseas típicas. O mecanismo fisiopatológico básico resulta do desequilíbrio na síntese de cadeias de globina, uma vez que a síntese de cadeias beta está reduzida ou mesmo ausente. Esse fato tem como consequência o acúmulo de cadeias livres no citoplasma das células eritropoiéticas, reticulócitos e hemácias. As cadeias alfa em excesso são instáveis e precipitam, formando corpúsculos de inclusão. Esses corpúsculos provocam profundas alterações metabólicas nos eritroblastos e são responsáveis pela eritropoiese ineficaz observada nesses pacientes. Além disso, causam alterações de membrana nas hemácias, que ao passar pelos sinusóides esplênicos serão fagocitadas, caracterizando a hemólise das síndromes talassêmicas (Bank, 1978).

Em consequência da intensa anemia, ocorre um retardo do crescimento e desenvolvimento e a criança torna-se progressivamente mais fraca, com grande susceptibilidade a infecções. As alterações ósseas observadas na anemia de Cooley são devidas fundamentalmente à hiperplasia e à hipertrofia da medula óssea. O tecido eritropoiético total nesses pacientes pode estar hipertrofiado até 40 vezes acima do normal, o que conduz ao clássico estado hipermetabólico, responsável por numerosas alterações orgânicas, como, emagrecimento, retardo do crescimento, hiperuricemia, febre e necessidades aumentadas de folato. A expansão da medula óssea, com aumento da pressão intra-medular, resul-

ta em atrofia das camadas esponjosa e cortical dos ossos, sendo frequentes as fraturas espontâneas.

A esplenomegalia e a hepatomegalia são características clínicas marcantes na talassemia maior, consequência da hemólise e da metaplasia mielóide que ocorrem nesses órgãos. Em consequência da grande esplenomegalia, naqueles casos não submetidos à terapia adequada, ocorrem frequentemente trombocitopenia e leucopenia secundárias. O grande número de transfusões sanguíneas, bem como o aumento de absorção de ferro, têm como consequência a grande sobrecarga de ferro observada nesses pacientes e que determina, em última análise, as complicações clínicas sideróticas que conduzem à morte os pacientes com talassemia beta homozigótica.

Por outro lado, os heterozigotos da talassemia beta apresentam geralmente discreta anemia hipocrômica e microcítica, sendo que sua expressão clínica é variável, uma vez que os seus portadores podem ser assintomáticos ou manifestar diversos graus de anemia. Frequentemente os heterozigotos da talassemia beta alternam períodos assintomáticos com períodos de anemia, sendo essa última geralmente mais acentuada em situações de sobrecarga para o organismo, como as representadas, por exemplo, pelo crescimento, pela gravidez e pela lactação. A análise das hemoglobinas, é conspícuo o aumento do percentual de hemoglobina A (Ramalho *et al.*, 1985).

-ASPECTOS MOLECULARES

As Síndromes Talassêmicas beta resultam, em sua maior parte, de mutações originárias de substituições de apenas um nucleotídeo (mutações de ponto) no gene da globina beta. Essas mutações foram extensivamente estudadas a partir de 1980, com o emprego de técnicas de clonagem e sequenciamento do gene beta mutante. A análise de haplótipos do complexo gênico da globina beta facilitou a identificação de novas mutações e, em meados de 1983, cerca de 40 mutações de ponto haviam sido identificadas (Treismann *et al.*, 1983)

A partir de 1985, a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) facilitou enormemente a amplificação de regiões do gene da globina beta a partir de DNA genômico extraído de leucócitos (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1987) e posterior sequenciamento dos produtos amplificados (Wong *et al.*, 1987; Engelke *et al.*, 1988). Através desse método foi possível caracterizar os alelos mais frequentes em um mesmo grupo étnico e em menos de 2 anos cerca de 50 novos alelos foram identificados (Kazazian *et al.*, 1988). Até o momento, foram descritas cerca de 103 mutações que conduzem à talassemia beta, que em seu conjunto perfazem mais de 45% dos alelos do gene da globina beta com manifestação clínica significativa. O percentual restante correspondente às mutações que originam alterações estruturais das hemoglobinas (Kazazian *et al.*, 1990).

A caracterização molecular dos vários alelos talassêmicos beta foi determinada em grande número de grupos populacionais (Antonarakis *et al.*, 1984; Kazazian *et al.*, 1984, 1986; Amselem *et al.*, 1988; Dias-chico *et al.*, 1988; Gonzalez-Redondo *et al.*, 1988; Thein *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1988; Fucharoen *et al.*, 1989; Rund *et al.*, 1989), evidenciando o ele-

vado grau de heterogeneidade subjacente às Síndromes Talassemicas. Por exemplo, na região da Sardenha, 95,4% dos alelos talassêmicos são devidos a uma única mutação (Cao et al., 1984), enquanto que em chineses de Kuontung, quatro alelos perfazem 90% dos casos de talassemia beta (Kazazian et al., 1986). Por outro lado, os 10% restantes compreendem cerca de 11 diferentes alelos.

O número total de mutações observadas em grupos populacionais bem estudados são: em chineses 15, negros americanos 12 e em populações da região do mediterrâneo 31. Como muitos alelos são encontrados em cada região, muitos indivíduos homozigotos são portadores de dois diferentes alelos e são denominados de geneticamente compostos, ao passo que o verdadeiros homozigotos possuem duas cópias do mesmo alelo (Kazazian et al., 1990).

-0 gene da globina beta

Os polipeptídeos que formam a hemoglobina humana são codificados por genes que estão situados em dois agrupamentos gênicos denominados alfa e beta. O agrupamento alfa localiza-se no braço curto do cromossomo 16 e inclui dois genes alfa (α_1 e α_2), dois genes de cadeia globínica embrionária (ζ , θ_1) e três genes não funcionais, os pseudogenes $\psi\zeta$, $\psi\alpha_1$ e $\psi\alpha_2$ (Laver *et al.*, 1980). O agrupamento beta localiza-se no braço curto do cromossomo 11 e inclui o gene da globina beta, o gene δ , os dois genes γ (γ^c e γ^f), um gene de cadeia embrionária ϵ e um pseudogene $\psi\beta$ (Fritsch *et al.*, 1980). Em ambos complexos os genes são arrançados na mesma orientação transcricional, seguindo a ordem embrionário-fetal-adulto (fig.1).

Como na maioria dos genes de organismos eucarióticos, o gene da globina beta é interrompido por íntrons (IVS-"Intervening sequences"), os quais separam a região codificadora em três exons (Tilghman *et al.*, 1978). O primeiro íntron, com 130 pares de bases (bp), localiza-se entre os códons 30 e 31 e o segundo, com 850 bp, localiza-se entre os códons 104 e 105 (fig.2). A transcrição tem início na região denominada sítio CAP, localizada 33 nucleotídeos anteriormente ao primeiro exon, continua pelos exons e íntrons e passa por fim pelo sítio de poliadenilação. O RNA formado é imediatamente modificado nas duas extremidades (chamadas extremidades 5' e 3'). A modificação da extremidade 5', catalizada pela enzima guanililtransferase, é a adição de um resíduo de G-metilada (CAP), em uma ligação trifosfatada. O final 3', é formado por clivagem, em analogia com a unidade de transcrição viral, e, em seguida, há a adição de 150 resíduos de A (poli A) pela enzima poli A polimerase. A estrutura CAP é considerada importante na

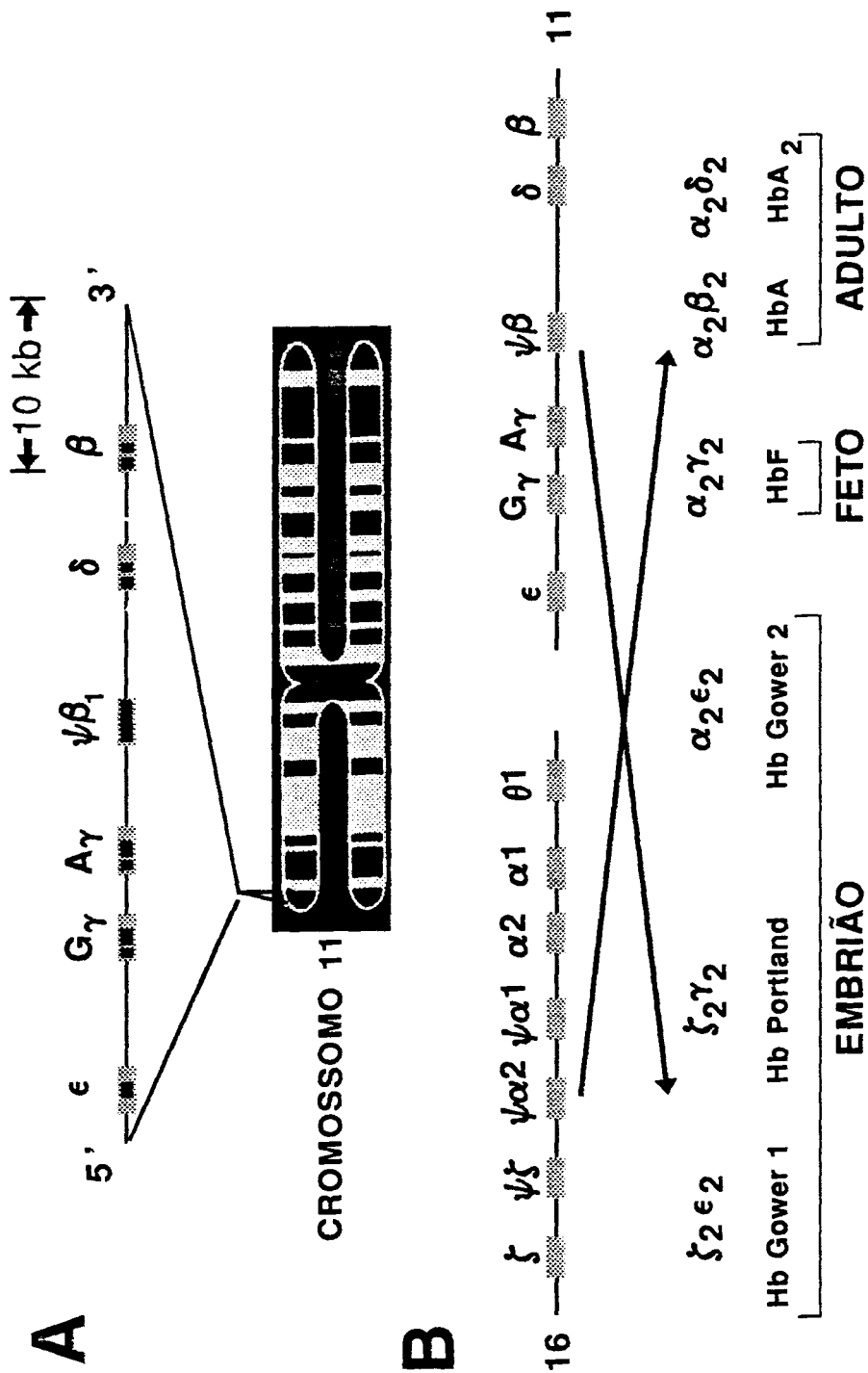


FIGURA 1 - A> COMPLEXO DOS GENES BETA
B> ORGANIZAÇÃO DOS GRUPAMENTOS
ALFA E BETA GLOBINA

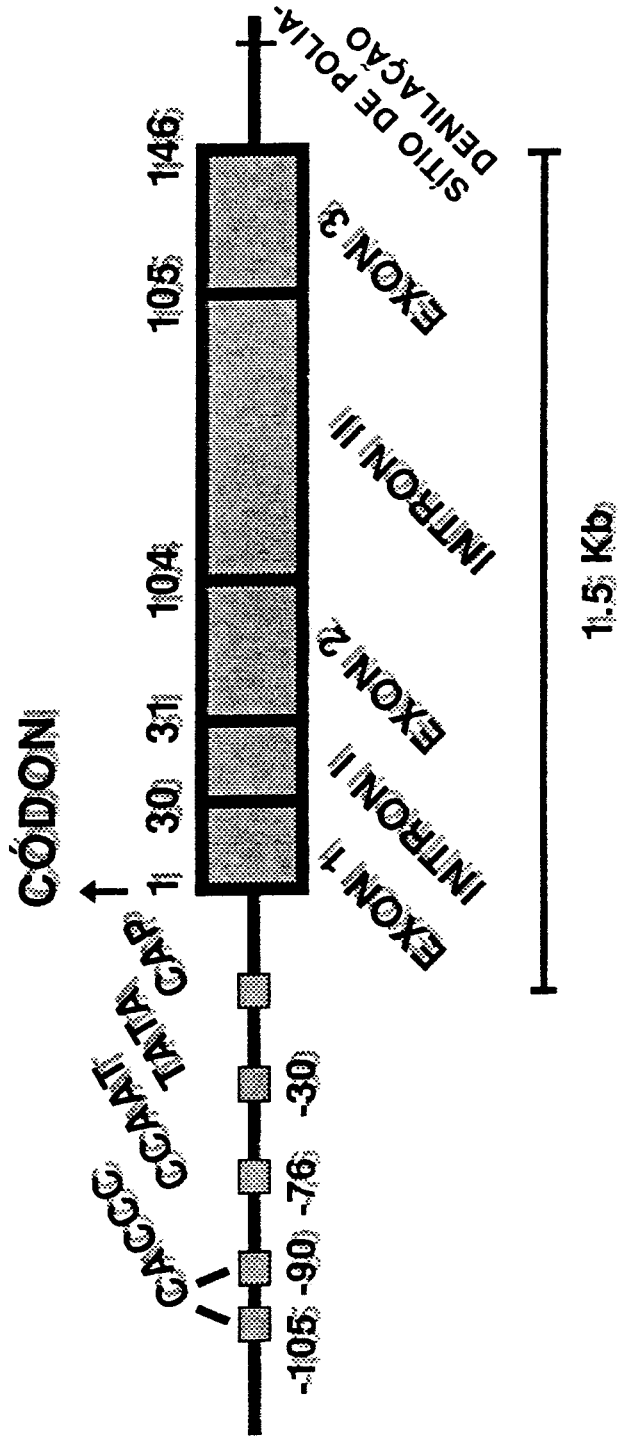


FIGURA 2 - O GENE DA GLOBINA BETA

tradução do RNA em proteína, enquanto que a cauda de poli A parece ter um papel fundamental na manutenção da estabilidade do RNA mensageiro (RNAm) (Leoncini,1987).

Os íntrons e exons transcritos dão origem ao RNA mensageiro precursor (HmRNA), que é metabolizado no núcleo, resultando na excisão dos íntrons e ligação dos três exons para formar o RNAm que é traduzido. Esse complexo processo é genericamente denominado de clivagem ou "splicing". Sequências de nucleotídeos críticas para o processo de clivagem estão situadas nas junções exon-íntron. Embora essas sequências envolvam grande número de nucleotídeos, é característico na extremidade 5' ou sítio doador o dinucleotídeo GT, e na extremidade 3', sítio receptor, AG (Breathnach *et al.*,1981).

O mecanismo de "splicing" inicia-se com a clivagem da extremidade 5'.Essa extremidade, então, liga-se com uma base A próxima a terminação 3'.Essa ligação covalente não é aleatória, ocorrendo sempre numa região receptora. Essa região apresenta uma sequência conservada entre genes ou espécies e é genericamente denominada de sequência de consenso PyXPyTAPy. Forma-se, portanto, uma estrutura em forma de laço ("lariat") (Padgett *et al.*,1984) (Fig.3). Esses laços são então clivados através de um complexo grupo de reações que resulta na ligação dos exons, ao passo que os íntrons não são aproveitados. Como referido anteriormente, outras sequências chaves nas junções são importantes para a eficiência desse mecanismo. Foram identificadas sequências de consenso, localizadas no sítio doador e no receptor. No sítio doador (final 5' dos íntrons) seriam os três últimos nucleotídeos do exon e os seis primeiros nucleotídeos do íntron. No sítio receptor (final 3' dos íntrons) seriam os dez últimos nucleotídeos dos íntrons e o primeiro nucleotídeo do exon (Shapiro *et al.*,1987).

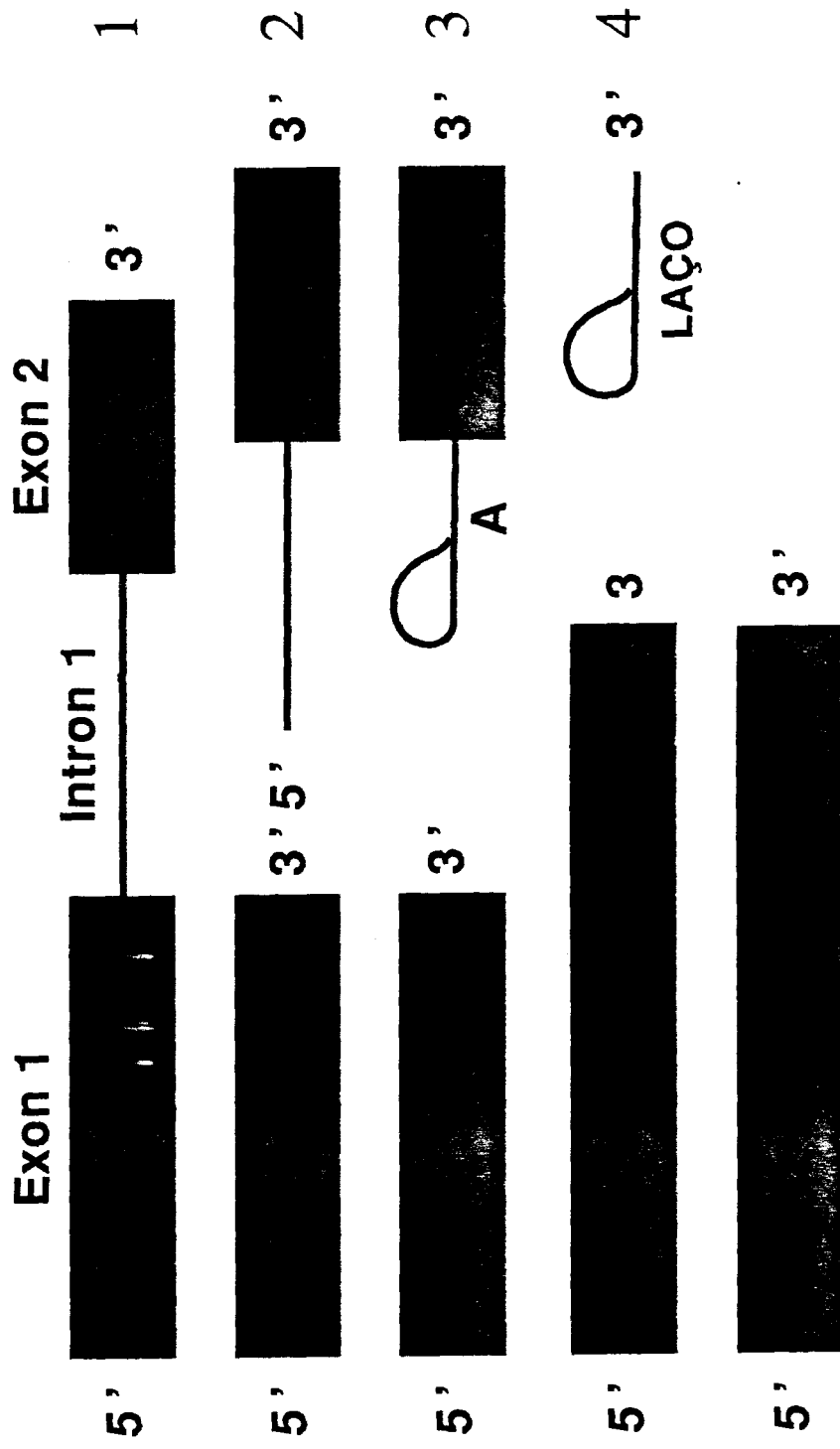


FIGURA 3 - EXCISÃO DE INTRON EM FORMA DE LAÇOS (LARIAT)

Completando a estrutura do gene da beta globina, existe a região promotora, que fica anterior à região estrutural do gene. Três sequências altamente conservadas são encontradas acima do sítio CAP. A sequência CACACCC, localizada na posição -90 em relação ao sítio CAP, é característica dos genes da globina beta (Efstratiadis *et al.*,1980; Lacy *et al.*,1980),mas não é encontrada na região correspondente do gene da globina alfa (Liebhaber *et al.*,1980;Michelson *et al.*,1980) ou outros genes de eucariotos. Uma sequência similar, CCTCACCC, também conservada entre genes da globina beta , é localizada na posição -105 (Efstratiadis *et al.*,1980). A sequência CCAAT, localizada na posição -76, é comum nos genes das globinas alfa e beta (Efstratiadis *et al.*,1980;Michelson *et al.*,1980). Em outros genes estruturais de eucariotos são relatadas sequências em posições análogas (Little *et al.*,1979). E, finalmente, observa-se a sequência TATA, localizada na posição -30 acima do sítio CAP, rica em nucleotídeos A e T.Essas sequências de região promotora são importantes na ativação gênica e interação com proteínas nucleares ("transactivating factor").

-MUTAÇÕES QUE DÃO ORIGEM AS TALASSEMIAS BETA

As numerosas mutações de ponto que resultam no fenótipo da talassemia beta são classificadas de acordo com o passo metabólico atingido e a região do gene em que ocorrem (Huisman,1992) (Fig.4). Sendo assim, podem afetar a transcrição, o metabolismo do RNA mensageiro, o transporte do RNA do núcleo para o citoplasma, a estabilidade do RNA ou uma combinação dessas alterações (Maquat *et al.*,1984).São descritas também, embora raras, deficiências gênicas parciais e totais (Forget *et.al.*,1983;Orkin *et.al.*,1984). Desse modo, pode-se resumir essas alterações da forma especificada na Tabela 1.

Alterações da Talassemia Beta	nº de mutações descritas
<u>A-Mutações na região promotora</u>	<u>19</u>
<u>B-Mutações que afetam o metabolismo do RNA</u>	
-região da junção exon-ínton	12
-região das sequências de consenso	15
-mudanças no interior do ínton criando sítios alternativos de clivagem	06
-mudanças no interior de exons ativando sítio alternativo de clivagem	04
<u>C-Mutações que criam um códon sem sentido ou "nonsense"</u>	<u>13</u>
<u>D-Mutações que mudam a fase de leitura do RNAm ou "frameshift"</u>	<u>32</u>
<u>E-Mutações nos sítios de clivagem de RNA e de poliadenilação</u>	<u>06</u>
<u>F-Mutações no sítio CAP</u>	<u>03</u>
<u>G-Mutações no códon de iniciação</u>	<u>03</u>
<u>H-Mutações que geram globinas instáveis</u>	<u>13</u>
<u>I-Deleções</u>	<u>10</u>
<u>TOTAL (1990)</u>	<u>136</u>

Tabela I: Classificação das alterações moleculares da Talassemia Beta.

(Huisman, 1992)

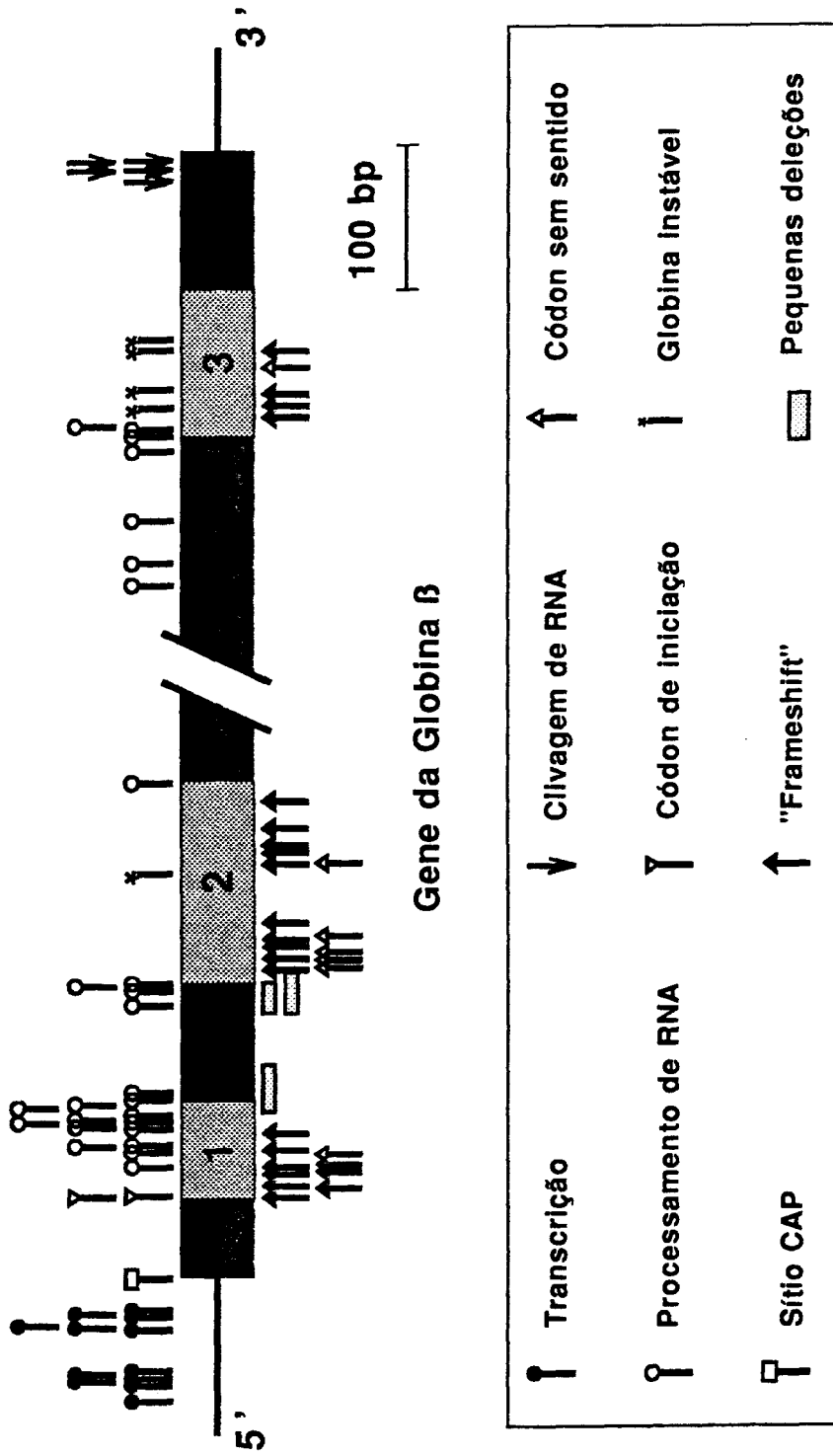


FIGURA 4 - MUTAÇÕES DE PONTO QUE PRODUZEM TALASSEMIA BETA

As mutações transcricionais ou aquelas que reduzem a transcrição do gene por alterarem a região promotora, concentram-se na região TATA ("TATA box") e nas sequências conservadas nas posições -90 e -105 em relação ao CAP. Estudos de transcrição "in vitro" indicam essas regiões como indispensáveis para transcrição eficiente e localização precisa do sítio iniciador da transcrição (Kazazian, 1987). Essas alterações são geralmente associadas a fenótipos com alterações clínicas leves. Entretanto, existem variações nesse fenótipo de acordo com as diferentes populações afetadas, provavelmente devido a existência de outras sequências gênicas modificadoras (Kazazian, 1990). Por exemplo, pacientes homocigotos negros com a mutação A→G na posição -29 são oligossintomáticos ou mesmo apresentam ausência de sintomas mesmo quando em homocigose (Antonarakis *et al.*, 1984). No entanto, são conhecidos homocigotos chineses com a mesma mutação que apresentam talassemia maior dependente de transfusão sanguínea (Huang *et al.*, 1986). Essas diferenças no fenótipo clínico seriam devidas à presença ou ausência de uma substituição acima da região promotora (C→T), localizada na posição -158 do gene β globina, que aumenta a produção da globina. Essa substituição está presente em negros com a mutação -29 e ausentes em chineses -29 (Huang *et al.*, 1986).

Dentre as mutações que afetam o metabolismo do RNA mensageiro, existem aquelas que afetam a junção exon-íntrom, as sequências de consenso, as que levam a mudanças no interior dos íntrons do gene da globina beta, gerando sítios anômalos de clivagem e as que conduzem a ativação de um sítio de clivagem alternativo no exon.

A mutação IVSI-1 (primeiro exon, posição 1) é um dos exemplos que alteram a junção exon-íntrom, impedindo o "splicing" desse íntrom. Nessa mutação há uma substituição G-A na posição 1 do primeiro íntrom, que modifica o sítio doador, com conseqüente abolição do mecanismo de "splicing" no íntrom. Assim, é produzido um RNAm totalmente anômalo, gerando um alelo que resulta na ausência da produção da globina beta (β^0). A descrição original foi realizada por Orkin *et al* em 1982 e estudos posteriores evidenciaram que essa mutação ocorre geralmente na população da bacia do Mediterrâneo. Sua prevalência foi estimada em 13,2% na população talassêmica na Grécia, 11,7% em Chipre, 3,1% na Sicília e 3,5% na Espanha. Em portugueses homozigotos sua prevalência foi estimada em 32%. Na região da Sardenha e na China esta alteração específica não foi observada (Gomes *et al.*, 1988; Huisman, 1990).

Entre as mutações que atingem as regiões de seqüências de consenso, a mais conhecida é a β^+ IVSI-6 (primeiro íntrom, posição 6), onde há uma troca de uma timina por uma citosina. Essa mutação provoca uma redução da eficiência do mecanismo de clivagem normal, conduzindo a uma redução de 50-75% na quantidade de RNAm normal, com redução semelhante na produção da globina beta. Também foi descrita por Orkin *et al* em 1982 e ocorre predominantemente em populações do Mediterrâneo. Sua prevalência foi estimada em 29% na população da Iugoslávia e da Sicília, 15,5% na Espanha, na Turquia 18,1%, 8,0% no Líbano, 8,7% em Chipre e 18,8% no Egito (Amselem *et al.*, 1988; Huisman, 1990; Novelletto *et al.*, 1990).

Dentre as mutações que alteram seqüências internas dos íntroms, duas se destacam: a β^+ IVSI-110 e a β^+ IVSII-745. A mutação β^+ IVSI-110 foi a primeira a ser descrita, independentemente, por Spritz e Westa-

way, em 1981. Neste caso, há uma troca de guanina por adenina, resultando em um novo sítio acceptor do "splicing". Este novo local tem preferência na clivagem em relação ao sítio normal, de tal maneira que origina um RNAm anômalo com 19 nucleotídeos pertencentes ao IVSI (intron 1). Esse tipo aberrante de RNAm perfaz cerca de 90% de todos os RNAm produzidos e não originará a proteína porque a inserção dos nucleotídeos extras conduz a um código de terminação precoce. Aproximadamente 10% do RNAm formado é normal, com grande redução na produção da globina normal. Assim, a mutação β^+ IVSI-6 tem uma expressão clínica mais benigna que a β^+ IVSI-110, pois nesta a produção de globina beta é muito reduzida. Sua prevalência é de 70% nos talassêmicos cipriotas, 62% nos libaneses, 42% nos gregos, 26,8% em sicilianos, 8,5% em espanhóis, 14,28% em portugueses e 0,4% em sardos. Não foi descrita em chineses (Amselem et al., 1988; Gomes et al., 1988; Huisman, 1990),

A mutação β^+ IVSI11-745, onde ocorre a substituição de uma citosina por uma guanina, da mesma maneira que a β^+ IVSI-110, cria um novo local de "splicing", um sítio doador com a sequência típica CACGT no interior do segundo intron. O RNAm anômalo assim produzido possui uma longa inserção de nucleotídeos, desde a posição 580 até a 745. Descrita em 1983 por Treisman et al., atinge prevalência de 10% na Bulgária, 8,3% em egípcios, 7% na Grécia, 5,6% nos cipriotas, 3,1% na Sicília, 0,4% na Sardenha e 1,7% na Espanha. Não foi identificada em portugueses e chineses (Amselem et al., 1988; Gomes et al., 1988; Huisman, 1990; Novelletto et al., 1990)..

Esse tipo de alteração pode ocorrer também no interior de exons, resultando então em fenótipo talassêmico e simultaneamente em uma hemoglobina estruturalmente anormal. Na região compreendida entre o có-

don 24 e 27, existe uma sequência GTGGTGAGG que é similar aquela de consenso da região de "splicing". Mudanças nessa região poderiam ativar esse sítio alternativo, fazendo com que a transcrição ocorra em parte nesse novo local. Assim, a primeira alteração descrita, por Orkin *et al.* (1982b), foi a hemoglobina E, com uma substituição de bases (G-T) no códon 27, que resulta na troca de um aminoácido no polipeptídeo beta (Glu-Lys). Além de resultar em uma variante estrutural, Hb E ($\alpha_2 \beta_2^E$), origina numa variante talassêmica, já que essa substituição ativou uma região de clivagem alternativa, formando um RNAm anômalo, que é posteriormente degradado. Como esse sítio alternativo não é utilizado preferencialmente, essa variante é considerada leve. Essas mutações no sítio alternativo no exon ilustram o fato de trocas em sequências codificantes poderem interferir no processamento do RNA, mostrando que esse é um processo dinâmico, onde várias sequências com diferentes afinidades aos fatores de clivagem interagem.

Outro grupo de alterações que se destaca pela prevalência com que ocorre em vários grupos populacionais é aquele que resulta em código precoce de terminação ou mutação ambar. Um exemplo desse tipo de mutação é a substituição do nucleotídeo citosina pela timina na posição 39, determinando o aparecimento de um código ambar de terminação, com a conseqüente terminação precoce do RNAm na síntese proteica. Desse modo, ocorre uma supressão total da síntese da globina, caracterizando um alelo β^0 . Outra característica importante da substituição no códon 39, é a criação de um sítio de clivagem da enzima de restrição Mae I, inexistente antes da mutação. É a alteração de maior prevalência nas populações da bacia do Mediterrâneo, estimada em 95% dos talassêmicos beta da Sardenha, 53,7% de Portugal, 36% da Sicília, 17% da

Grécia, 21,9% da Bulgária, 4% da Turquia e Líbano e 2,16% do Egito. Não foi detectada em negros americanos, chineses e espanhóis (Amselem et.al.,1988;Gomes et.al.,1988;Huisman,1990).

As mutações que alteram a fase de leitura do código genético ("frameshift") resultam da deficiência de um, dois ou quatro pares de bases ou mesmo adição de um par de bases. Com isso, a leitura do RNAm acontece fora da fase normal, não produzindo proteína normal mas sim uma anômala. Em apenas um caso foi descrito a produção diminuída de globina beta, na deleção -G dos códons 109/110.

Existem ainda mutações que alteram o sítio de clivagem do RNA, o sítio de poliadenilação, o sítio CAP, o códon de iniciação, prejudicando ou mesmo impedindo o mecanismo normal de "splicing". São mutações de ocorrência rara nas várias populações estudadas. Dentre essas, apenas as mutações do códon de iniciação dão origem à talassemia β^0 ; as demais, resultam em talassemia β^+ .

II-OBJETIVOS

Na população brasileira existe apenas um relato das anormalidades moleculares nas talassemias beta (Costa *et. al.*, 1990). Esse estudo, levado a efeito em um pequeno grupo de homozigotos, sugere que na população paulista aproximadamente 90% das mutações são restritas ao grupo β^+ 39, β^+ IVSI-110 e β^+ IVSI-6. É possível, no entanto, que o estudo de homozigotos da talassemia beta não forneça dados representativos da real distribuição dos alelos talassêmicos na população. Muitos pacientes com evolução benigna, embora homozigotos, poderiam não ser detectados, acarretando desse modo, um valor elevado para os alelos com expressão clínica mais grave.

Além do aspecto acadêmico, importa ressaltar que o conhecimento das prevalências dos genes talassêmicos beta em nossa população é importante para os programas de controle e terapêutica dessa doença, como reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1985).

Portanto, o presente estudo tem por objetivo primordial estimar a prevalência das mutações de ponto em uma amostra de heterozigotos da talassemia beta, não consanguíneos de pacientes com talassemia maior. Além disso, visa também permitir a análise comparativa entre os diversos tipos de mutações no que se refere aos dados hematimétricos e de eletroforese de hemoglobina nessa população.

III-CASUÍSTICA e MÉTODOS

Foram estudados 70 indivíduos encaminhados aos Ambulatórios de Hematologia do depto. de Clínica Médica (26 indiv.) e ao programa de aconselhamento genético do depto. de Genética Médica (44 indiv.)-UNICAMP, compreendendo 46 mulheres e 24 homens. Os pacientes não eram consanguíneos, e não foram incluídos indivíduos relacionados a pacientes com talassemia beta homozigótica. A idade dos indivíduos variou de 16 a 66 anos (\bar{X} =33.21, DP=110.03).

O diagnóstico foi levado a efeito pelos valores hematimétricos, eletroforese de hemoglobinas em fita de acetato de celulose com tampão tris-EDTA-Borato pH 8.9 e estudo familiar (Maquat et al., 1981). Os índices hematológicos foram determinados em um Contador Automático (Coulter mod. SSr). A determinação de Hb A₂ foi realizada por eluição de hemoglobinas, após eletroforese em fitas de acetato de celulose (Maquat et al., 1981). A hemoglobina fetal foi medida pelo método de desnaturação alcalina (Forget et al., 1983).

A caracterização das mutações foi realizada pela amplificação do gene da globina beta e posterior hibridização com oligonucleotídeos alelo-específicos (ASO). Nesse tipo de experimento, o fragmento amplificado é imobilizado em duplicata em filtro de nylon. Como sondas são utilizados oligonucleotídeos que variam unicamente na região da mutação a ser estudada. Uma sonda corresponde ao alelo normal e outra corresponde ao alelo mutante. Uma das amostras imobilizadas no filtro de nylon é hibridizada com a sonda normal, ao passo que a outra é com a sonda mutante. As condições da hibridização e lavagem dos filtros são

realizadas com estringência necessária para identificar sequências que diferem por somente um nucleotídeo.

Assim, é possível identificar indivíduos homozigotos ou heterozigotos de uma determinada mutação: os homozigotos mostrarão reação positiva somente com a sonda mutante e reação negativa com a sonda normal; os heterozigotos mostrarão reação positiva com ambas; e aqueles que não possuem esta mutação mostrarão reação positiva apenas com a sonda normal. Com esse procedimento, foi possível a caracterização das mutações β^c39 , β^c IVSI-1, β^+ IVSI-110 e β^+ IVSI-6.

Por outro lado, a mutação β^+ IVSII-745 foi identificada pela digestão do fragmento amplificado pela enzima Rsa I, já que essa mutação cria um sítio de clivagem para esta enzima de restrição.

1-Extração de DNA

Foram colhidos 10 a 20 ml de sangue estéril em EDTA 10% como anticoagulante. Para a lise das hemácias, a amostra de sangue foi centrifugada a 2.000 rpm por 10 minutos, e após o descarte do plasma adicionado a uma mistura das soluções de cloreto de amônio 0.144 M, 5 vezes o volume de células e carbonato de cálcio 0,01 M, 0,5 vez o volume de células. Após repouso à temperatura ambiente por 15 minutos, foi centrifugado por 20 minutos a 2.000 rpm. Foi removido o sobrenadante e o concentrado de leucócitos foi guardado a -70°C até extração do DNA.

Ao concentrado ainda congelado e mantido em gelo, foi adicionado tampão de lise até atingir o volume final de 2.5 ml para amostras com

até 5.000 leucócitos/cm³, 5 ml para amostras com até 25.000 leucócitos/cm³ e 10 ml para amostras com até 50.000 leucócitos/cm³. O tampão de lise 10X consistiu em: NaCl 3 M, EDTA 100 mM e tris-HCl 100 mM pH 7.5. Para um volume final de 10 ml foi utilizado 1 ml de tampão de lise 10X, 6 ml de água e 4,2 g de uréia. O concentrado foi desfeito mantendo o tubo no gelo, foi adicionado 100 ul de SDS 20% por ml de tampão de lise adicionado e incubado a 37°C por uma noite.

Foi adicionado o mesmo volume de fenol/clorofórmio (1:1). Agitada por 10 minutos lentamente, a amostra foi a seguir centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm, a fase aquosa superior foi transferida para outro tubo e repetida a extração com fenol/clorofórmio. Após a última extração feita somente com clorofórmio V:V com o tampão, foi transferida a fase superior para um novo tubo. Para a precipitação do DNA, foi adicionado 10% do volume de acetato de sódio 3 M e 2.5 volumes de etanol absoluto gelado (-20°C). Depois de misturado lentamente por inversão do tubo até a precipitação, o DNA foi então transferido para um tubo de microcentrífuga e o etanol foi removido completamente. O DNA precipitado foi dissolvido em TE 1X ou água e deixado a 4°C até que o DNA entre em solução.

2-Amplificação Gênica

A reação em cadeia da polimerase seguiu o método descrito por Saiki e col., 1988 com algumas modificações. Dois fragmentos do gene da globina beta foram amplificados (Fig.5). O primeiro, com uma extensão

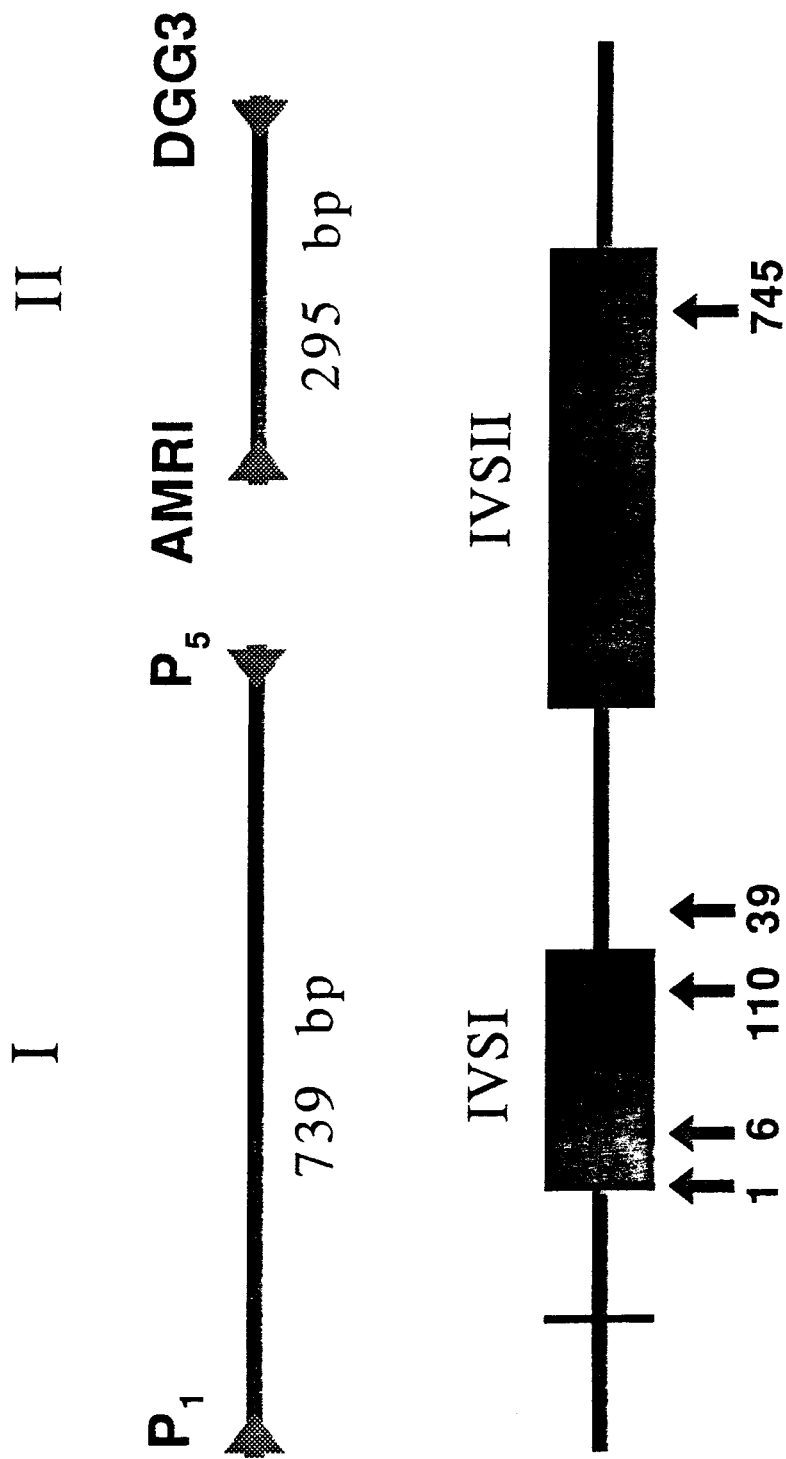


FIGURA 5 - LOCALIZAÇÃO DOS "PRIMERS" E MUTAÇÕES ESTUDADAS

de 739 pares de bases (bp) , inclui os exons 1 e 2 e o primeiro íntron do gene da globina beta. Foram utilizados os "primers" P1 (localizado na posição -129 em relação ao sítio CAP) e P5 (localizado no IVSII, nt 115).O segundo, com 295 pares de base de extensão , incluía o final do IVSII e a primeira metade do exon 3, e foi amplificado com os "primers" AMR1 (localizado no IVSII,nt 684) e o DGGE 3 (localizado no exon 3, códon 132). As sequências dos "primers" encontram-se na Tabela II.

A mistura de reação consistiu de 100 ul, contendo 100 pM de cada "primer", 200 uM da mistura de nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e DTTP), tampão da enzima (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCL pH 8.3 e 1.5 mM Mg-Cl₂) e 3 unidades de Taq polimerase. A quantidade de DNA em cada reação foi 0.5 ug . Ao volume final foram adicionados 2 gotas de óleo mineral. As reações da P.C.R. ("Polymerase Chain Reaction") foram efetuadas em aparelho ciclador de temperatura "DNA Thermal Cycler". As condições de reação consistiram em uma desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos, seguida de 40 ciclos de: 94°C por 1 minuto e 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 30 segundos e 72°C por 2 minutos.

3-Fixação do DNA em filtros de nylon - "Dot-Blotting"

O DNA amplificado foi então imobilizado em filtros de nylon (Fig.6) da seguinte maneira: Para 100 ul do DNA amplificado, adiciona-se 300 ul de solução NaOH 0.4 N e EDTA 25 Mm.Após incubação por 5 minutos à temperatura ambiente, a mistura foi aplicada em volumes iguais a duas membranas de nylon no sistema de "dot-blot" com posterior fixação por aquecimento em estufa por 2 horas a 80°C.

4-Hibridização

A hibridização foi feita utilizando-se sondas alelo específicas para as mutações β^c 39, β^s IVSI-1, β^+ IVSI-6 e β^+ IVSI-110, segundo a Tabela II.

"primer"	5'-	constituição	-3'
P1		GTA CGG CTG TCA TCA CTT AGA C	
P5		TCA TTC GTC TGT TTC CCA TTC	
AMR1		CTG CAT ATA AAT TGT AAC TG	
DGGE3	IGC145	TCT GAT AGG CAG CCT GCA CT	
sondas	5'-	constituição	-3'
β^c 39 normal		GCC TTG CAC CCA GAG GTT CT	
β^c 39 mutante		GCC TTG GAC CTA GAG GTT CT	
β^+ IVSI-110 normal		CTG CCT ATT GGT CTA TTT T	
β^+ IVSI-110 mutante		CTG CCT ATT AGT CTA TTT T	
β^+ IVSI-6 normal		GCA GGT TGG TAT CAA GGT T	
β^+ IVSI-6 mutante		GCA GGT TGG CAT CAA GGT T	
β^s IVSI-1 normal		CCT GGG CAG GTT GGT ATC	
β^s IVSI-1 mutante		CCT GGG CAG ATT GGT ATC	

TABELA II-Constituição de "primers" e sondas utilizadas na detecção das mutações da talassemia beta.

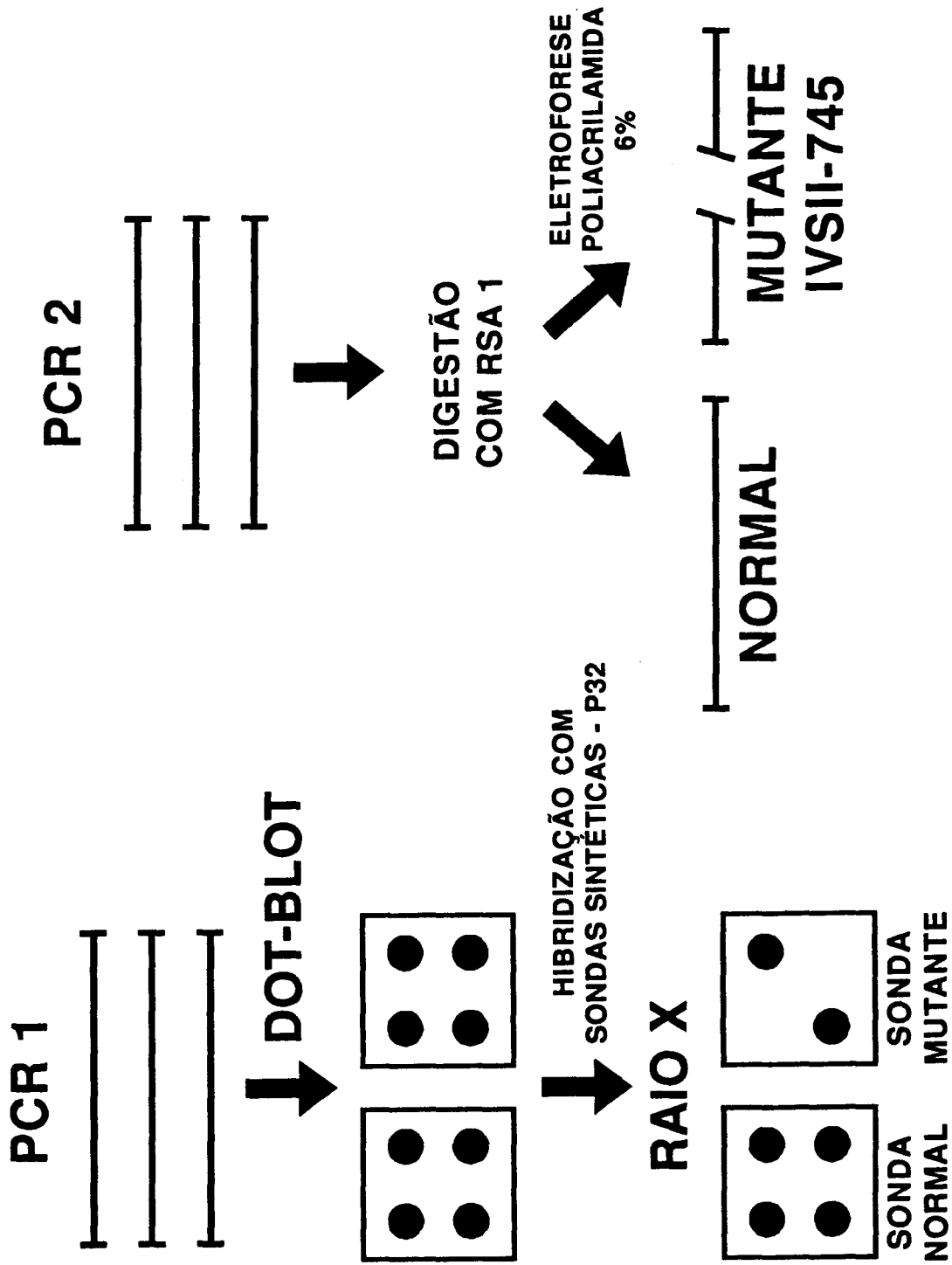


FIG 6 - ESQUEMA METODOLÓGICO DO ASO E DA DIGESTÃO COM RSA 1

a-Marcação da sonda com isótopos radioativos

As sondas foram marcadas com γ ATP fósforo 32 e T4 polinucleotídeo quinase: 100 pmoles da sonda, tampão T4 (0.05 M Tris-HCl pH 7.6, 0.01 M MgCl₂ , 5 mM DTT, 0.1 mM espermidina, 0.1 mM EDTA), 50 pmoles de [γ -³²P]ATP (ativ. esp. 3.000 Ci/mmoles) e 15 unidades da T4 polinucleotídeo quinase. Após incubação a 37°C por 2 horas, a reação é interrompida pela adição de 100 ul de STE (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA pH 8.0). Foram feitas 2 extrações V:V com fenol/clorofórmio e 1 extração V:V com clorofórmio. As sondas foram purificadas em colunas de Sephadex G50. A eficiência da marcação foi avaliada pela contagem de radioatividade em um contador de radioatividade beta (cintilador).

b-Pré-Hibridização

Os filtros foram colocados no interior de um recipiente plástico flexível contendo 10 ml do tampão de hibridização (5 X SSPE (NaCl 3M, NaH₂PO₄ .H₂O 0.2M e EDTA 0.02M), Denhardt's 2 X (Denhardt's 50X =5 g. Ficoll, 5 g polivinilpirrolone , 5 g. de soro albumina bovina e água até completar o volume pra 500 ml) , SDS 0.1 %) e incubados por 2 horas à temperatura apropriada para cada sonda, segundo a tabela III . A temperatura é variável de acordo com a constituição da sonda utilizada, devendo ser padronizada em temperatura 2 a 3 graus menor que a temperatura de "melting", que é calculada como $T_m = (n^\circ \text{ de G} + n^\circ \text{ de C}) \times 4 + (n^\circ \text{ de A} + n^\circ \text{ de T}) \times 2$.

c-Hibridização

Após a pré-hibridização as sondas préviamente marcadas foram adicionadas aos sacos plásticos na razão de 5×10^6 cpm por ml de tampão e incubadas adicionalmente por mais 2 horas na mesma temperatura de pré-hibridização.

d-Lavagens

Foram realizadas 3 lavagens, sendo as 2 primeiras em temperatura ambiente por 5 e 15 minutos respectivamente, em solução 2X SSPE e 0.1% SDS. A temperatura da terceira lavagem foi calculada como $T_M + 2$, e efetuada em solução 5X SSPE (NaCl 3 M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2 M e EDTA 0,02 M) e 0.1% SDS.

Após a hibridização os filtros foram secos e expostos em filme de raió X durante a noite, a temperatura ambiente sem o uso de intensificadores de imagem ou a -70°C por 2 horas com a utilização de intensificadores.

sonda para a região da mutação	Temperatura de Hibridização ($^\circ\text{C}$)	Temperatura de Lavagem ($^\circ\text{C}$)
β^- 39	55	62
β^0 IVS1-1	57	61
β^+ IVS1-6	55	60
β^+ IVS1-110	48	52

TABELA III-Temperaturas utilizadas na hibridização e lavagem.

5-Digestão com a enzima Rsa I

Para a identificação da mutação β^+ IVSII-745, foi utilizada a enzima de restrição Rsa I, com sítio de clivagem na sequência GTIAC na região da mutação IVSII-745 e inexistente nessa região no gene normal. A 10 μ l do amplificado II ("primers" AMRI e DGGE3), foram adicionada 10 unidades da enzima Rsa I e 1.5 μ l de tampão 50 mM Tris-HCl pH 8.0 e 10 mM MgCl₂, com incubação a 37°C por uma noite. A seguir foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e coloração com brometo de etídio e visualização das bandas formadas em transiluminador com luz ultra violeta. Assim, na ausência dessa mutação era visível apenas uma banda de 295 pares de bases, nos heterozigotos para esta mutação, eram visíveis duas bandas, uma de 295 e outra de cerca de 140 pares de bases (o amplificado digerido da origem a dois fragmentos, um de 138 e outro de 157 pares de bases, e que são distinguíveis no gel) e no homozigoto mutante seria visível apenas a banda de cerca de 140 pares de bases (Fig.6).

6-"Southern blot"

Para estudo do complexo de genes alfa foi levado a efeito a digestão do DNA com as enzimas BamH I e Bgl II, eletroforese em gel de agarose, transferência para filtros de nylon e hibridização com sondas do gene alfa como descrito anteriormente (Sonati et al., 1991a).

IV-RESULTADOS

1-ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS e ELETROFORESE DE HEMOGLOBINAS

A Tabela IV mostra os resultados dos índices hematimétricos e das dosagens de hemoglobinas A₂ e F nos pacientes estudados. Estes exames foram realizados no Laboratório de Hematologia do Departamento de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

paciente	sexo	idade	GV	HB	HT	VCM	HCM	A ₂	F
1- CTA	F	52	5.7	12.1	41.1	71.0	20.9	5.0	1.7
2- MRC	F	24	6.0	10.8	33.7	56.0	18.1	4.5	0.7
3- LGC	M	30	5.0	10.2	30.0	60.0	20.3	4.8	2.0
4- MFF	F	28	5.5	11.1	33.0	60.0	20.2	5.3	1.5
5- EL	M	21	6.4	12.0	42.4	65.7	19.5	5.0	1.8
6- VP	M	40	5.3	11.3	34.5	64.5	21.1	4.5	0.8
7- MLP	F	28	4.7	11.6	33.3	74.4	24.6	5.3	0.8
8- APP	F	42	5.5	11.4	34.2	62.0	20.6	4.6	1.4
9- GAR	M	16	5.8	11.9	30.0	66.0	20.0	5.6	0.8
10-AMZ	F	28	5.3	10.6	34.8	65.8	20.0	5.7	2.6
11-IC	M	27	5.4	10.5	34.6	63.6	19.4	5.8	0.5
12-EPT	F	50	5.6	12.0	39.6	71.0	21.2	5.4	1.2
13-MHPS	F	33	5.5	11.3	34.4	62.0	20.1	4.7	1.3
14-AT	F	19	5.4	10.9	32.6	61.0	20.6	5.2	0.5
15-RM	F	25	6.3	12.0	40.3	64.0	19.0	5.7	1.1
16-JAM	M	35	4.7	11.6	35.0	74.4	24.6	5.9	1.3
17-RTB	F	58	5.4	10.2	32.1	59.0	18.5	5.0	0.6

cont.

paciente	sexo	idade	GV	HB	HT	VCM	HCM	A ₂	F
18-JAS	M	66	4.8	10.3	30.0	62.5	21.5	4.4	0.5
19-MTSB	F	44	5.5	11.6	33.4	61.0	21.5	5.3	1.4
20-LCD	F	42	5.2	11.6	35.8	69.0	22.4	5.5	0.5
21-MAFUP	F	28	6.2	11.2	35.4	57.0	17.7	5.2	0.8
22-JIM	M	48	5.4	10.8	36.7	68.3	20.1	4.9	1.2
23-SC	F	23	5.3	10.8	37.0	70.0	20.3	5.7	1.5
24-RBS	F	47	5.2	12.1	36.8	70.0	23.6	3.5	0.5
25-MCCS	F	40	5.0	10.6	34.3	69.0	21.1	5.1	2.6
26-JM	M	32	7.3	14.4	41.3	58.0	20.4	5.5	0.8
27-AAB	F	37	6.1	12.7	38.6	63.0	20.8	4.9	2.7
28-MMGS	F	34	4.8	14.1	43.2	87.0	28.4	3.4	0.7
29-MOGL	F	45	5.9	11.8	34.6	58.6	20.0	5.1	0.5
30-EMG	F	42	4.9	10.5	30.0	61.0	20.2	4.9	1.3
31-SM	F	28	5.6	12.0	39.6	70.7	21.4	5.0	0.7
32-WR	M	40	6.5	13.3	38.8	60.0	20.3	5.2	3.1
33-DF	M	33	6.6	13.2	41.0	62.0	19.9	5.3	5.0
34-MHRC	F	40	5.6	11.8	39.3	71.0	21.4	5.6	0.4
35-CDN	F	22	5.7	11.2	36.0	64.0	19.9	5.1	5.5
36-RS	M	16	4.8	9.5	29.1	61.0	19.9	5.7	0.8
37-IBV	F	41	5.8	11.1	35.5	61.0	19.1	5.8	1.1
38-JES	M	28	6.1	14.2	41.4	67.0	23.1	4.3	0.9
39-ETP	F	30	5.6	13.1	40.2	72.0	23.4	5.4	0.8
40-MCFC	F	26	6.0	11.5	35.9	61.0	19.4	5.8	1.3
41-CRM	M	21	5.8	11.1	35.6	61.0	19.0	5.3	0.9
42-VLCP	F	30	5.6	11.6	35.8	64.0	20.6	5.1	0.7

cont.

paciente	sexo	idade	GV	HB	HT	VCM	HCM	A ₂	F
43-MFM	F	28	5.9	11.6	34.6	59.0	19.7	5.8	1.6
44-SS	F	32	5.1	10.0	29.5	57.4	19.4	5.7	0.8
45-MLA	F	50	5.8	11.3	36.3	62.6	19.5	4.7	0.8
46-ED	F	45	4.9	10.2	31.1	67.0	22.8	7.7	1.5
47-JA	M	40	4.8	10.4	35.1	72.1	21.5	5.6	2.4
48-JR	M	25	5.7	13.8	45.7	80.4	24.3	3.6	1.7
49-MF	M	31	5.6	11.2	36.0	64.0	19.9	5.1	1.3
50-ACM	F	40	5.5	11.9	39.2	70.5	21.4	5.6	0.8
51-FM	F	31	5.1	12.1	35.5	69.1	23.5	5.2	0.7
52-MGS	F	32	6.1	11.8	36.5	59.8	19.3	5.2	1.2
53-CS	M	35	5.9	11.6	35.8	60.7	19.6	5.4	0.7
54-OCF	F	21	5.5	11.1	36.7	66.5	20.1	4.6	1.8
55-LAP	F	25	5.2	12.0	35.1	66.8	22.8	5.0	1.3
56-CCP	M	30	6.1	11.3	36.5	59.3	18.4	5.1	0.5
57-MSC	F	21	5.6	11.8	35.5	62.8	20.8	4.6	1.3
58-JEB	F	42	5.0	10.8	30.0	60.2	21.7	5.3	0.8
59-RCB	M	32	5.6	12.2	34.7	61.3	21.5	5.1	1.7
60-JCF	F	19	5.6	11.4	30.2	54.0	20.4	4.7	0.7
61-RHR	M	25	6.0	11.2	37.0	61.8	18.7	5.0	1.4
62-AAM	M	29	6.0	11.8	36.8	61.2	19.6	4.3	2.0
63-FS	F	32	5.7	10.3	34.4	60.5	18.1	4.0	0.8
64-MAR	F	30	5.4	11.3	42.1	77.4	20.7	4.8	0.8
65-JSM	F	40	5.6	10.8	35.0	62.0	19.1	3.9	0.9
66-ASS	M	25	5.5	10.8	34.8	62.6	19.4	4.3	0.5
67-ASM	F	21	5.6	11.2	35.8	63.7	19.9	4.7	1.3

cont.									
paciente	sexo	idade	GV	HB	HT	VCM	HCM	A ₂	F
68-OR	F	45	5.5	10.9	34.3	62.6	19.9	5.6	0.8
69-SM	F	31	5.3	11.3	36.8	69.7	21.4	5.0	1.8
70-MMS	M	29	5.6	11.6	35.5	63.5	20.7	4.5	1.7
X		33.2	5.6	11.5	35.8	64.7	20.7	5.0	1.3
dp		10.0	0.4	0.9	03.5	05.8	01.7	0.6	0.9

GV-Glóbulos vermelhos ($\times 10^6$ /l), HB-hemoglobina (g/dl), HT-hematócrito (%), VCM-volume corpuscular médio (fl), HCM-hemoglobina corpuscular média (pg), A₂-hemoglobina A₂ (%) e F-hemoglobina Fetal (%).

TABELA IV-índices hematimétricos e dosagens de hemoglobina em 70 indivíduos heterozigotos para talassemia beta.

2-Caracterização da Anormalidade Molecular

2.1-Hibridização

Na Figura 7 podem ser observados os resultados obtidos com os pacientes 1A, 1B, 1C, 1D, 2B e 2C, ocorreu marcação positiva para a sonda normal e a sonda correspondente ao alelo mutante, indicando que os pacientes são heterozigotos para a mutação $\beta^{\circ}39$. Os demais pacientes estudados não possuem essa mutação.

A figura 8 mostra o resultado obtido com a sonda IVSI-110 e a figura 9 com a sonda β^+ IVSI-6. Os pacientes 1A, 1C, 2A, 2C e 3C são heterozigotos do alelo β^+ IVSI-110 e o paciente 2C é heterozigoto da mutação β^+ IVSI-6.

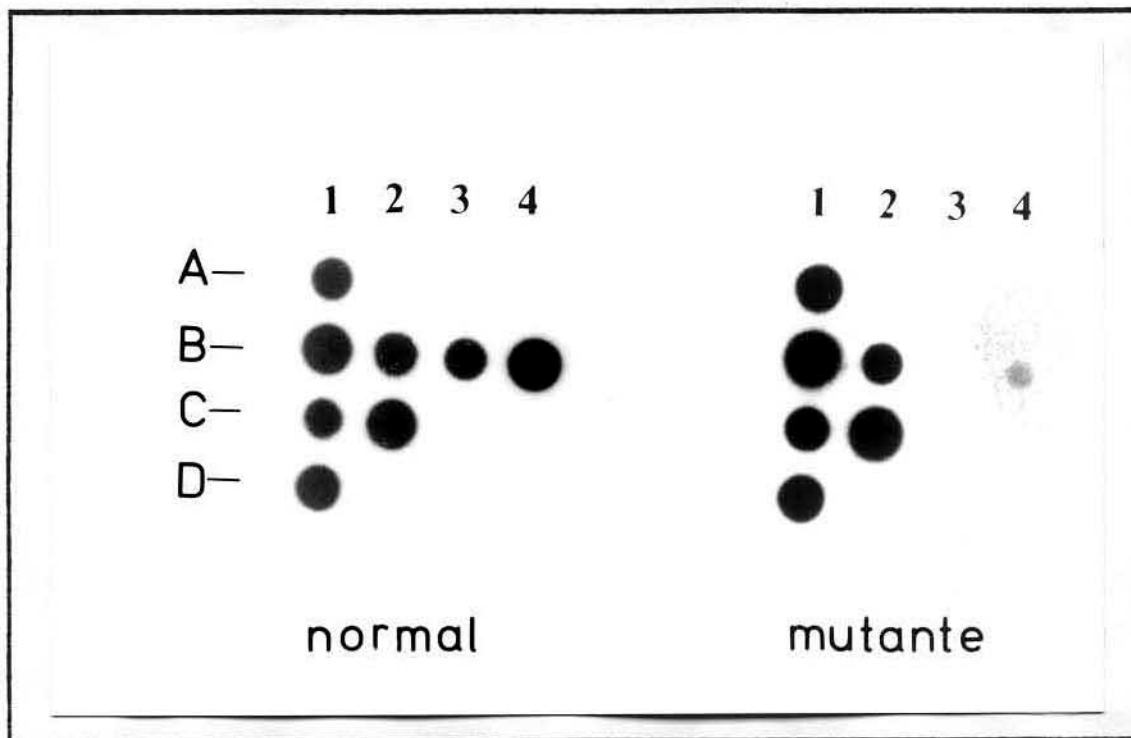
A sonda para a mutação β° IVSI-1 foi utilizada na figura 10, onde o paciente 2A é heterozigoto dessa mutação.

2.2-Digestão com a enzima Rsa I para detecção da mutação β^+ IVSII-745

A presença da mutação β^+ IVSII-745 pode ser detectada pela digestão de um fragmento específico do gene da globina beta pela enzima Rsa I. No gene normal não existe o sítio de clivagem dessa enzima.

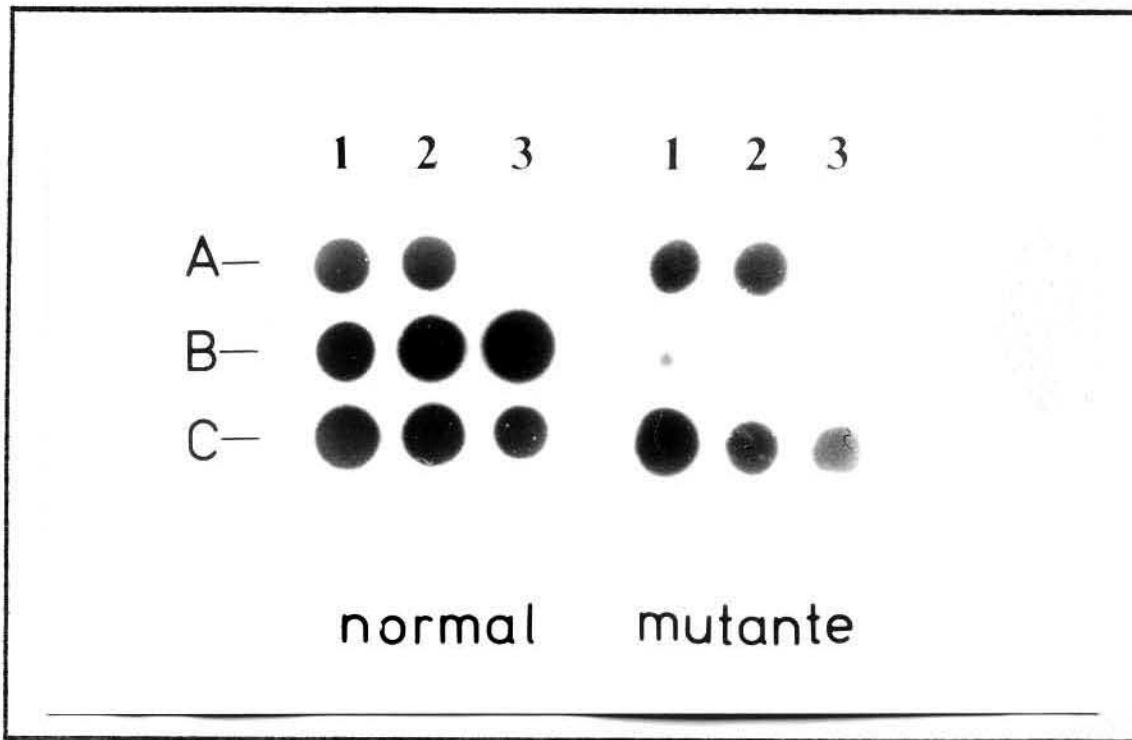
A figura 11 mostra o padrão eletroforético típico de um indivíduo heterozigoto dessa mutação, além daquele peculiar a indivíduos em que a alteração está ausente.

Na amostragem estudada não foram observados casos desse tipo de anormalidade.



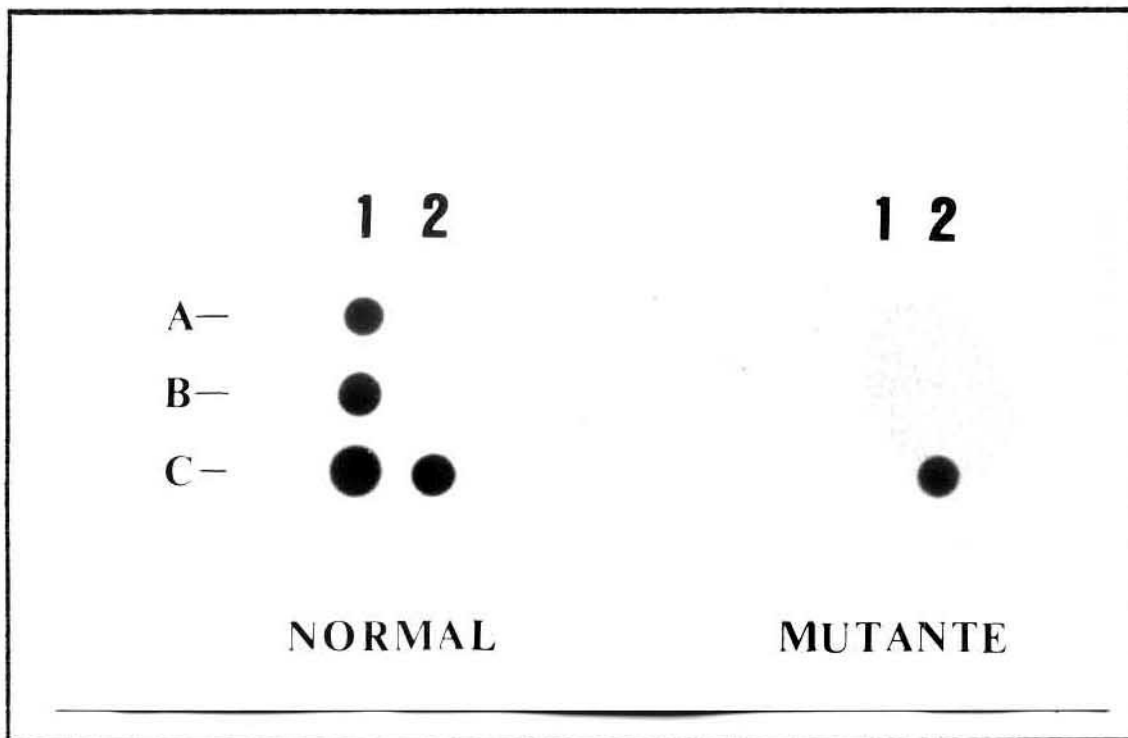
	1	2	3	4
A	A1			
B	B1	B2	B3	B4
C	C1	C2		
D	D1			

FIGURA 7-Autorradiografia de filtro (Dot-Blot) hibridizado com sonda para a mutação β^0 39 e sonda normal. Os indivíduos 1A, 1B, 1C, 1D, 2B e 2C, apresentaram marcação positiva, com intensidade semelhante, com as duas sondas, sendo portanto, heterozigotos para a mutação β^0 39 (O DNA foi imobilizado apenas nas posições marcadas no mapa abaixo da foto).



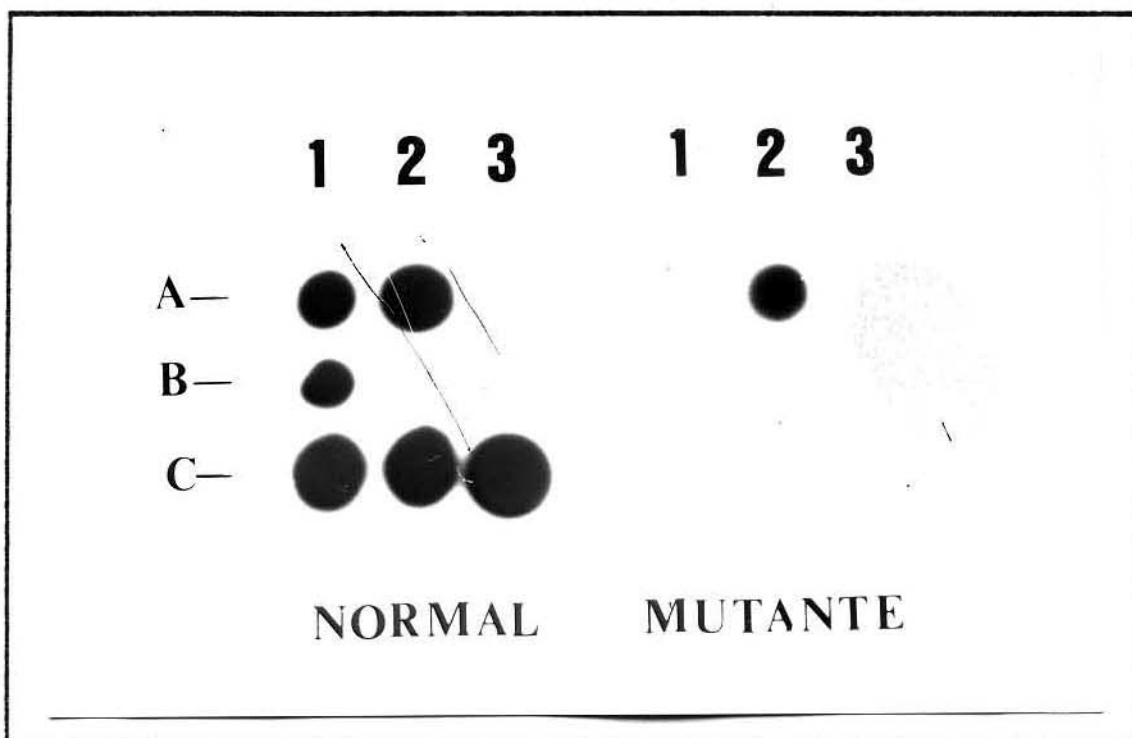
	1	2	3
A	A1	A2	
B	B1	B2	B3
C	C1	C2	C3

FIGURA 8-Autorradiografia de filtro (Dot-blot) hibridizado com sonda para a mutação $\beta^+IVS1-110$ e sonda normal. Os indivíduos 1A, 1C, 2A, 2C e 3C apresentaram marcação positiva, com intensidade semelhante, com as duas sondas, sendo portanto, heterozigotos para a mutação $\beta^+IVS1-110$.



	1	2
A	A1	
B	B1	
C	C1	C2

FIGURA 9-Autorradiografia de filtro (Dot-blot) hibridizado com sonda para a mutação β^+ IVSI-6 e sonda normal. O indivíduo 2C apresentou marcação positiva, com intensidade semelhante, com as sondas normal e mutante, portanto, trata-se de um heterozigoto para a mutação β^+ IVSI-6.



	1	2	3
A	A1	A2	
B	B1		
C	C1	C2	C3

FIGURA 10-Autorradiografia de filtro (Dot-blot) hibridizado com a sonda para a mutação β^0 IVSI-1 e sonda normal. Apenas o indivíduo 2A apresentou marcação positiva, com intensidade semelhante, com as duas sondas, sendo um heterozigoto para essa mutação.

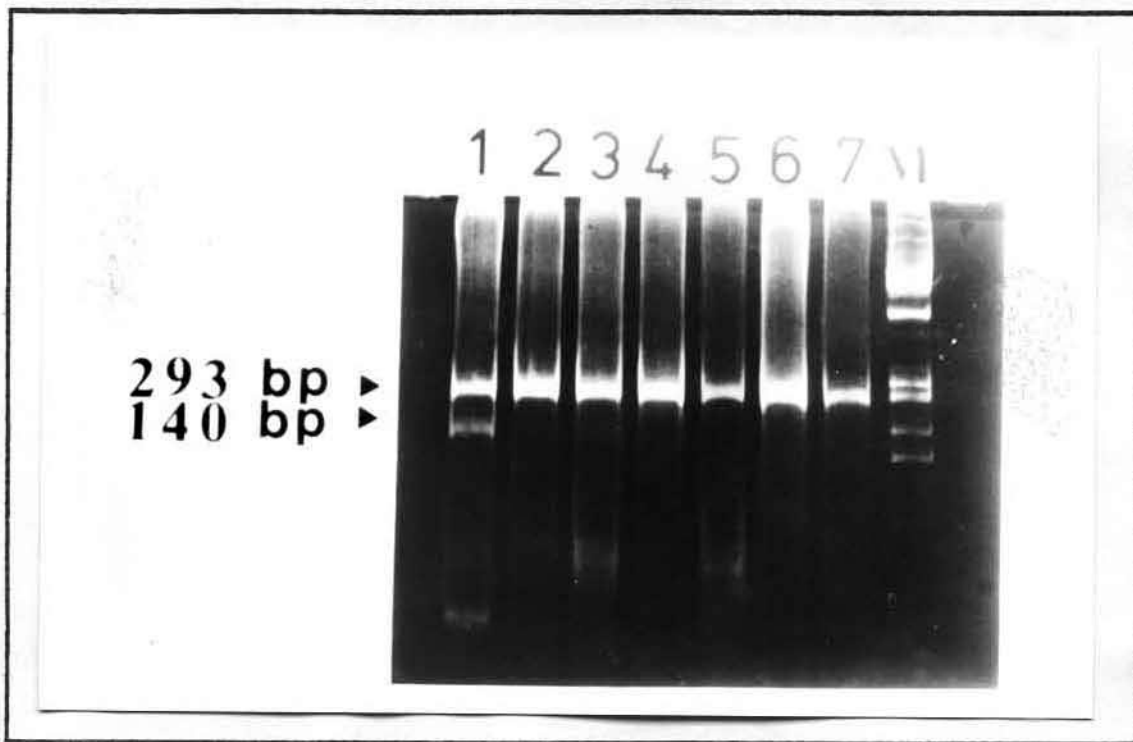


FIGURA 11-Eletroforese em gel de poliacrilamida do amplificado II digerido com a enzima Rsa I. Na posição 1 vemos um controle positivo, em que a banda de cerca de 140 bp aparece, mostrando que houve a digestão com a enzima Rsa I.

2.3-Prevalência das mutações na amostra estudada

Dos 70 pacientes heterozigotos da talassemia beta analisados, 45 eram portadores da mutação β^0 39 (64.28%), 14 da β^+ IVSI-110 (20.02%), 5 da β^+ IVSI-6 (7.14%) e 4 da β^0 IVSI-1 (5.71%). Todos os indivíduos eram realmente heterozigotos da mutação detectada. Nenhum dos pacientes teve o seu DNA digerido com a enzima Rsa I, significando a ausência da mutação β^+ IVSII-745 nessa amostra. Apenas dois pacientes não tiveram suas mutações identificadas pela metodologia empregada. A Tabela V resume os dados observados.

tipo de mutação	Nº de indivíduos (%)
β^0 39	45 (64.28)
β^+ IVSI-110	14 (20.02)
β^+ IVSI-6	05 (07.14)
β^0 IVSI-1	04 (05.71)
β^+ IVSII-745	00 -
outras	02 (02.85)

TABELA V-Prevalência das mutações da talassemia beta em 70 pacientes heterozigotos .

3-Comparação entre os dados hematimétricos observados nas diferentes mutações

Com o objetivo de avaliar a influência de cada tipo específico de mutação nos dados hematimétricos, foram analisados o VCM, HCM, dosagens de Hb A₂ e F nos indivíduos com os diferentes tipos de mutações. Foi estudado também o complexo dos genes alfa através de "Southern blot" e afastada a concomitância de alfa talassemia. Os resultados encontram-se nas Tabelas VI e VII.

mutação	GV	Hb	Ht	VCM	HCM	A ₂	F
	\bar{X} (DP)	\bar{X} (DP)	\bar{X} (DP)	\bar{X} (DP)	\bar{X} (DP)	\bar{X} (DP)	\bar{X} (DP)
39	5.48 (0.84)	11.23 (1.40)	35.61 (3.78)	66.13 (8.21)	20.71 (2.43)	5.08 (0.82)	1.60 (1.37)
IVSI-110	5.05 (0.71)	10.82 (2.34)	33.48 (5.74)	69.05 (9.30)	21.55 (3.80)	4.96 (0.87)	0.82 (0.49)
IVSI-6	5.69 (0.45)	13.36 (1.11)	41.30 (4.45)	72.46 (7.03)	23.66 (0.60)	3.63 (0.61)	1.03 (0.61)
IVSI-1	5.43 (0.55)	10.60 (0.34)	33.83 (2.80)	63.76 (6.75)	20.33 (2.35)	5.73 (1.72)	1.14 (0.35)
outras	6.16 (0.28)	11.55 (0.45)	39.00 (3.40)	63.35 (2.35)	19.25 (0.25)	5.15 (0.15)	1.35 (0.45)

TABELA VI - Média (\bar{X}) e Desvio Padrão (DP) dos índices hematimétricos e níveis de hemoglobina dos pacientes heterozigotos da talassemia beta.

A Tabela VII resume as comparações estatísticas grupo a grupo entre os diversos tipos de mutações encontradas. As diferenças estatisticamente significantes foram observadas entre os portadores das mutações $\beta^{\circ} 39$ e $\beta^{+} IVS1-6$ com relação ao nível de hemoglobina A₂ e HCM, entre o grupo de β° e β^{+} quanto ao nível de hemoglobina fetal e entre, grupos $\beta^{+} IVS1-6$ e $\beta^{\circ} IVS1-1$ em relação aos níveis de Hb A₂ e HCM.

amostra	A		F		VCM		HCM	
	H (P)		H (P)		H (P)		H (P)	
TOTAL	§	5.95 (0.11)	5.02 (0.17)	2.95 (0.39)	6.03 (0.10)			
$\beta^{\circ} 39X \beta^{+} 110$	*	0.15 (0.69)	4.81 (0.02)	0.65 (0.41)	1.06 (0.30)			
$\beta^{\circ} 39X \beta^{+} 6$	*	5.46 (0.01)	0.33 (0.56)	2.21 (0.13)	4.97 (0.02)			
$\beta^{\circ} 39X \beta^{\circ} 1$	*	0.38 (0.84)	0.08 (0.77)	0.12 (0.72)	0.06 (0.79)			
$\beta^{+} 110X \beta^{+} 6$	*	3.76 (0.52)	0.51 (0.47)	0.66 (0.41)	2.66 (0.10)			
$\beta^{+} 6 X \beta^{\circ} 1$	*	3.85 (0.04)	0.04 (0.82)	1.71 (0.19)	3.85 (0.04)			
$\beta^{\circ} X \beta^{+}$	*	2.13 (0.14)	4.35 (0.03)	2.09 (0.14)	3.68 (0.05)			

§ - Df=3 , * - Df=1 e P=probabilidade

TABELA VII-Resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis utilizado nos dados hematimétricos de pacientes heterozigotos da talassemia beta.

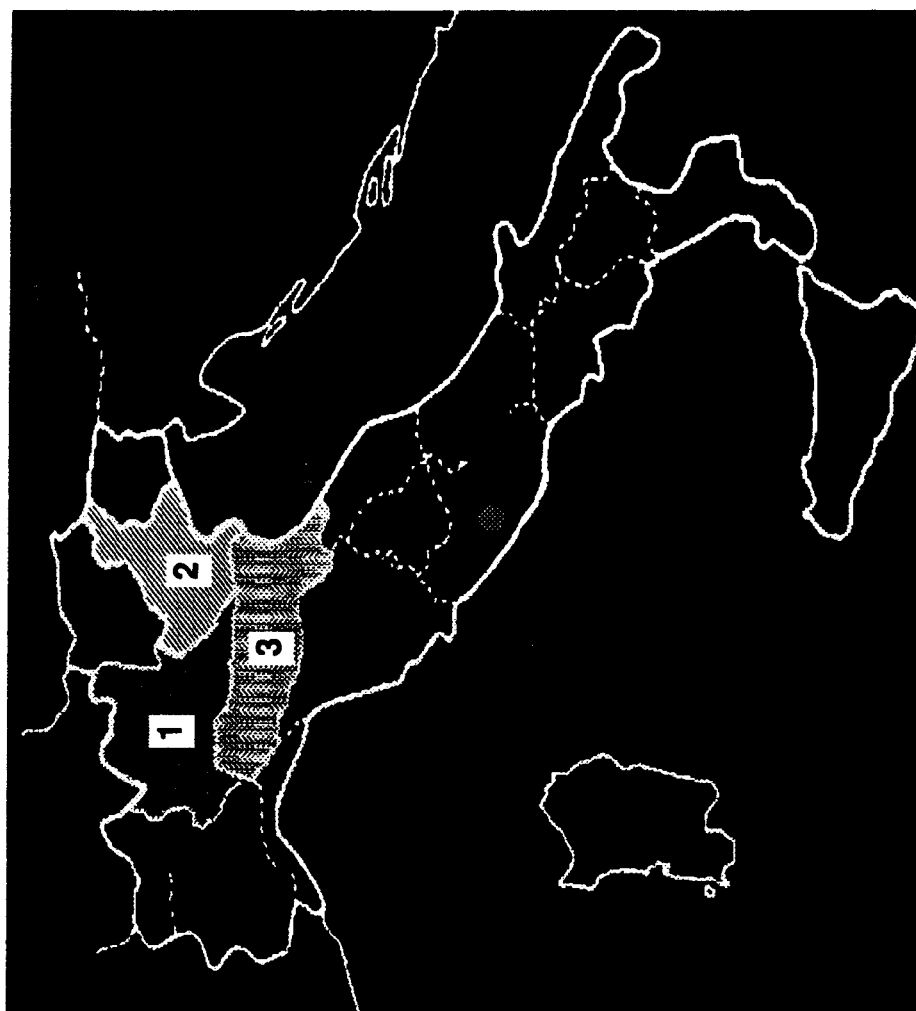
Esses resultados indicam que a mutação β^+ IVSI-6 apresenta menores percentagens de Hb A₂ e maiores valores de HCM que as mutações β^o 39 e β^+ IVSI.110. As outras mutações não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si quanto aos dados hematimétricos e de eletroforese de hemoglobinas.

V-DISCUSSAO

A origem étnica da população brasileira é heterogênea e irregularmente distribuída no país. Além dos colonizadores portugueses, o Brasil recebeu maciços contingentes de escravos africanos e de imigrantes da Itália, Espanha, Japão, Alemanha e Oriente Médio.

No Estado de São Paulo houve grande fluxo migratório a partir de 1880, com ápice no período compreendido entre 1900 a 1920. As origens desses imigrantes eram variadas, mas predominavam os oriundos da Itália e Portugal. Os dados do censo de 1950 indicaram a seguinte distribuição entre os imigrantes: 23.2% eram italianos, 22.2% portugueses, 14.4% espanhóis, 3.6% alemães, 3.3% sírios, 1.2% austríacos e 0.5% franceses, excluindo aqueles naturalizados (Saldanha, 1968). Quando comparados aos números do mesmo censo incluindo todo o País, as percentagens eram pouco diferentes, mas persistia a predominância de italianos e portugueses (Saldanha, 1968). Os imigrantes italianos eram oriundos de regiões rurais do norte da Itália (Figura 13), principalmente das regiões de Veneto (Veneza, Pádua, Treviso, Rovigo e Verona), Lombardia (Mantua e Milão) e Emília Romana (Ferrara, Bologna, Parma e Modena).

Todos esses grupos raciais estão submetidos a um progressivo processo de miscigenação. A magnitude desse evento é de difícil avaliação no país como um todo, mas a análise conduzida por Azevedo e col., 1981 na Ilha de Itaparica no Estado da Bahia mostrou que a proporção de mulatos praticamente duplicou, ao passo que a de brancos foi reduzida a um terço em cerca de 90 anos (1889-1980). Estes dados reforçam a idéia de que a frequência de anormalidades hereditárias das



- 1 - LOMBARDIA
- 2 - VENETO
- 3 - EMÍLIA
ROMAGNA

**FIGURA 12 - REGIÕES ITALIANAS DE ONDE SE ORIGINARAM
OS IMIGRANTES DO ESTADO DE SÃO PAULO**

hemoglobinas devem variar nas diferentes regiões do país e refletem as origens étnicas e o grau de miscigenação das populações envolvidas.

Em relação às síndromes talassêmicas Beta no Estado de São Paulo, investigações baseadas em dados clínicos, genéticos, hematológicos e bioquímicos mostraram que a maioria dos homocigotos e heterocigotos eram descendentes de imigrantes italianos. Poucos dados foram relatados nesta população relativos a pacientes descendentes de portugueses, espanhóis ou africanos. Nesse particular, importa ressaltar que a investigação sistemática de mais de 3.000 pacientes do HC-UNICAMP com suspeita de hemoglobinopatia revelou a presença de apenas 2 pacientes negros com talassemia beta heterocigótica (Sonati et al., 1991b).

Assim, seria previsível a predominância na população estudada de mutações oriundas dos grupos originários da Itália, embora a contribuição de mutações com prevalência elevada em Portugal, como a $\beta^{IV-SI-6}$, fosse esperada com frequência significativa. Os resultados encontrados neste trabalho mostraram predominância conspícua da mutação β^{39} e que somente 4 mutações, todas de origem mediterrânea, são responsáveis por cerca de 97% dos casos analisados. A frequência dessas mutações é peculiar e, em geral, difere daquelas observadas na maioria das regiões da Itália, Portugal e Espanha.

Investigações sistemáticas mostraram que na região norte da Itália é encontrada uma maior heterogeneidade nas alterações moleculares da talassemia beta do que no sul (Thein et al., 1985). Esse fato é explicado pela varia da migração de populações de outras partes do continente para o norte da Itália, ao passo que no sul haveria influência predominante de populações gregas devido às sucessivas inva-

sões dessa região por esses povos ao redor do ano II DC (Maggio et al., 1990). A frequência das alterações moleculares observadas nas diferentes regiões da Itália apresentam padrões variáveis de distribuição. Por exemplo, na região norte da Itália, Thein et al. (1985) demonstraram em amostra populacional da região de Milão frequência de 22% da mutação β^+ IVSI-110 e 66% da mutação β^0 39 (Cao, 1992). Na região de Ferrara, essa última alteração atinge 51.4% dos talassêmicos. Em outras populações do norte da Itália, Lombardia, Piemonte, Liguria, Toscana, Marche, Umbria e Abruzzo, foram encontradas as frequências de 54% da mutação β^0 39, 19.3% da β^+ IVSI-110 e 3.8% da β^+ IVSI-6 (Cao, 1992). Por outro lado, em algumas regiões do sul da Itália, como na Sardenha, 95% das mutações observadas são do tipo β^0 39. Já na Sicília, foram encontradas 32% dos cromossomos talassemicos com a mutação β^0 39, 23.5% com a β^+ IVSI-110, 9.8% com β^0 IVSI-1, 14.3% com β^+ IVSI-6, 3.3% com β^0 IVSII-1 e 3.3% de β^+ IVSII-745 (Cao, 1992). Como já referido, essa distribuição deve ter sido influenciada pelas invasões gregas dessa região. Na população grega, por exemplo, essas mutações atingem as seguintes frequências: 17% β^0 39, 42.5% β^+ IVSI-110, 7.2% da β^+ IVSI-6 e 13.2% da β^0 IVSI-1 (Huissman et al., 1992).

Na Espanha, as prevalências das mutações descritas indicaram frequências de 64% da β^0 39, 8.5% da β^+ IVSI-110, 15% da β^+ IVSI-6 e 3.5% da β^0 IVSI-1 (Amselem et al., 1988). Em Portugal, Gomes et al. (1988), ao analisarem pacientes com talassemia homozigótica, encontraram 53% da mutação β^0 39, 10% da β^+ IVSI-110 e 32% da β^0 IVSI-1. Por outro lado, Tamagnini et al., 1990, estudaram pacientes com talassemia maior e intermediária e verificaram a prevalência de 73% da mutação β^+ IVSI-6, 5.7% da β^0 39 e 7.69% da β^0 IVSI-1. Estes dados confirmaram

que a mutação β^+ IVSI-6 representa um alelo talassêmico com evolução clínica benigna e quando em homozigose ou em associação com outros alelos, resulta com frequência no quadro clínico de talassemia intermediária.

A comparação dos dados desse trabalho com os vários segmentos populacionais da região do Mediterrâneo, indica uma grande proximidade com aqueles descritos nas regiões de Milão, Lombardia e Delta do Pó, demonstrando realmente, em nossa região uma marcante influência dos imigrantes da região norte da Itália. Por outro lado, as mutações β^0 IVSI-1 e β^+ IVSI-6, observada com elevada frequência em alguns estudos em Portugal, foram encontradas com baixa frequência na amostra estudada.

mutação	Milão	Sardenha	Delta Pó	Sicília	Lazio	Lombardia	Brasil
β° 39	66	95.0	61.5	32.0	48.1	54.0	64.28
β^+ IVSI-110	22	0.4	25.6	23.5	11.5	19.3	20.02
β^+ IVSI-6	-	-	2.6	14.3	3.9	3.8	7.14
β° IVSL-1	-	-	2.6	9.8	5.8	-	5.71
mutação	Campania	Calábria	Puglia	Grécia	Espanha	Portugal	
β° 39	48.8	21.3	34.9	17.0	64.0	35.71	
β^+ IVSI-110	14.8	31.9	26.4	42.5	8.5	4.28	
β^+ IVSI-6	8.6	12.8	11.3	7.2	15.0	20.00	
β° IVSI-1	8.6	10.6	13.8	13.2	3.5	22.85	

TABELA VIII-Prevalência (%) das mutações mais frequentes no Brasil em outras regiões da Itália e Mediterrâneo.

Embora com limitações conhecidas, como diferentes formas de obtenção das casuísticas, diferentes faixas etárias, etc, a comparação estatística entre esses diversos grupos populacionais e a população analisada nesse trabalho, mostra a possível similariedade entre a população brasileira estudada e as das regiões italianas de Delta do Pó, Lombardia e Milão (Tab. IX).

Região geográfica	\bar{X}	P
a-Lázio	18.989	7.89 10.
b-Calábria	34.787	5.22 10.
c-Puglia	22.885	1.33 10.
d-Campania	12.786	0.0124.
e-Sicília	24.975	5.09 10.
f-Delta Pó	4.689	0.3207.
g-Lombardia	3.886	0.2767.
h-Milão	0.198	0.9058.
i-Sardenha	103.050	<<<0.0001.
j-Grécia	72.924	3.90 10.
l-Espanha	7.076	0.1319.
m-Portugal	31.438	2.49 10.

A análise de pacientes homocigotos para talassemia beta no Brasil mostrou frequências de 47% para a mutação β^0 39, 27% para a β^+ IV-SI-110 e 15% para a β^+ IVSI-6 nos cromossomos estudados. Os dados aqui descritos combinados aos dados daquele estudo permitem a estimativa de frequência gênica de cada mutação na população estudada. Cabe ressaltar as limitações dessas amostras populacionais para este tipo de cálculo. No entanto, como são os únicos dados disponíveis de populações brasileiras, os dados obtidos representariam uma estimativa possível para essas frequências gênicas.

Como descrito, a frequência de heterozigotos da talassemia beta entre caucasóides do nosso Estado é de 1% e a estimativa da frequência de homozigotos seria de 25/100.000. Pela equação de Hardy-Weinberg $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, podemos deduzir que a frequência de normalidade seria de 0.989979, e portanto, $q=0.994975$. Como investigamos heterozigotos da talassemia beta ao dividirmos as proporções encontradas por $2q$, encontramos a frequência gênica de cada alelo. A multiplicação de nossos resultados por 1% resultaria em valores representativos da população em geral. Com isso temos:

alelo	frequência gênica estimada
β^0 39	0.003230
β^+ IVSI-110	0.001006
β^+ IVSI-6	0.000359
β^0 IVSI-1	0.000287
outras	0.000144

Podemos calcular também a ocorrência dos homozigotos verdadeiros e compostos com as frequências gênicas estimadas a partir dos heterozigotos, como representado na Tabela X.

genótipos*	Prevalência geral	Prevalência entre homozigotos
39/39	0.00001043	0.4172
110/110	0.00000101	0.0404
6/6	0.00000013	0.0052
1/1	0.00000008	0.0032
outras/outras	0.00000002	0.0008
39/110	0.00000650	0.2600
39/6	0.00000232	0.0928
39/1	0.00000185	0.0740
39/outras	0.00000093	0.0372
110/6	0.00000072	0.0288
110/1	0.00000058	0.0232
110/outras	0.00000029	0.0116
6/1	0.00000021	0.0084
6/outras	0.00000010	0.0040
1/outras	0.00000008	0.0033

* abreviações 39= β^0 39, 110= β^1 IVSI-110, 6= β^1 IVSI-6 e 1= β^0 IVSI-1.

TABELA X: Estimativa de ocorrência dos homozigotos verdadeiros e compostos.

A comparação dessas prevalências estimadas de homozigotos com os achados de Costa et al, 1990, mostra concordância para todas as combinações, com exceção dos homozigotos 6/6 e 110/outras, como pode ser observado na Tabela XI.

genótipo	Costa et al.	estimado	\bar{X}	P
39/39	5	7.92	1.0760	0.20 < P < 0.30
110/110	1	0.76	0.0750	0.70 < P < 0.80
6/6	1	0.09	8.3020	P < 0.01
39/110	5	4.94	0.0007	0.95 < P < 0.98
39/6	3	1.76	0.8736	0.30 < P < 0.50
110/6	2	0.55	3.8227	0.05 < P < 0.10
110/outras	2	0.22	14.4000	P < 0.001

TABELA XI: Comparação entre os dados estimados e os achados de Costa et al., 1990.

Como exemplificado pelos trabalhos desenvolvidos em Portugal, a análise unicamente de pacientes homocigotos poderia levar a uma sub-estimativa das frequências das mutações mais benignas do ponto de vista clínico. Este fato poderia ocorrer pois a homocigose ou associação com outros alelos poderiam resultar em quadro clínico de talassemia intermediária com poucas alterações clínicas e que seriam passíveis de não serem detectadas ou encaminhadas para serviços médicos. Desse modo, estudo de amostras de heterocigotos não consanguíneos de homocigotos, embora ainda que constituídas de indivíduos detectados em hospitais, serviços de hemoterapia ou laboratórios clínicos, seria mais

representativo da distribuição das mutações na população geral. Importa ressaltar que estes indivíduos não apresentam manifestações clínicas significativas e, em geral, são identificados fortuitamente ao realizarem exames hematológicos de rotina.

No entanto, a frequência da mutação $\beta^+IVSI-6$ observada nesse trabalho não foi maior do que a encontrada em homozigotos. Sómente nos genótipos com a participação dessa mutação verificamos uma diferença significativa entre a estimativa de frequência e os resultados observados em homozigotos. Uma explicação possível para esse achado, seria devido ao fato de estes heterozigotos apresentarem menor incremento de Hb A₂ e VCM e HCM com valores mais elevados que as outras mutações. Assim, seriam mais susceptíveis de não serem detectados pelas técnicas de rotina no estudo hematológico. É possível também, que essas discrepâncias possam ser devidas ao tamanho amostral, limitado devido as características da metodologia envolvida no estudo.

A relação entre os índices hematimétricos, níveis de Hb A₂ e F e os tipos de mutações da talassemia tem sido objeto de recentes análises em diferentes populações. Codrington et al. (1990) estudaram os níveis de hemoglobina fetal e A em indivíduos normais e heterozigotos da talassemia beta dos Estados Unidos. Os indivíduos portadores das mutações talassemicas -29, -88, $\beta^0IVSI-1$ e $\beta^0IVSII-1$, apresentaram níveis de fetal acima de 1%, enquanto que os portadores das mutações $\beta^+IVSI-6$, $\beta^+IVSI-110$, 24, 39, 41/42 e $\beta^+IVSII-745$, apresentaram níveis normais de hemoglobina fetal. Além disso, foram observados níveis menores de hemoglobina A nos indivíduos portadores de mutações com expressão clínica mais brandas como a $\beta^+IVSI-6$. Rund et al. (1992) estudaram a relação entre a microcitose e as mutações de heterozigotos

da talassemia beta. Em 113 indivíduos de Israel, 18 diferentes mutações foram identificadas (9- β^0 e o restante β^+). A média dos VCM entre os indivíduos portadores de mutação β^+ foi de 62.9 e os β^0 foi de 69.3. O nível médio de Hb A₂ foi de 5.13 em mutações β^+ e 4.28 em β^0 . Rosatelli et al. (1992) na Itália, estudaram 126 heterozigotos talassêmicos e demonstraram que os portadores da mutação β^+ IVSI-6 produzem glóbulos vermelhos maiores e com mais hemoglobina. As mutações β^+ IVSI-110 e β^+ IVSI-6 mostraram menores aumentos de Hb A₂ quando comparados as outras mutações.

Os dados obtidos nesse trabalho são concordantes com esses relatos e os pacientes com a mutação β^+ IVSI-6 mostraram os menores níveis de Hb A₂, estatisticamente significativos quando comparados aos dos indivíduos com β^0 39 e β^+ IVSI-110. Além disso, apresentaram os maiores VCM e HCM, indicativo de produção de hemácias maiores e com mais hemoglobina do que as outras mutações. Em relação ao nível de hemoglobina fetal, encontramos uma ligeira elevação nos indivíduos portadores de mutações β^0 , estatisticamente significativo quando comparado a indivíduos com a mutação β^+ , e os valores menores ocorreram naqueles pacientes com a mutação β^+ IVSI-110. Os índices mais elevados de Hb Fetal foram encontrado em portadores da mutação β^0 39.

CONCLUDES

Em seu conjunto, os dados aqui obtidos facultam concluir que as mutações da talassemia beta nessa população do Estado de São Paulo são representadas por aquelas originárias do Mediterrâneo e que quatro alterações (β^0 39, β^+ IVSI-110, β^+ IVSI-6 e β^0 IVSI-1) compreendem 97% dos casos de talassemia.

Esses resultados são importantes porque além de caracterizar a população estudada sob o ponto de vista de alterações moleculares, fornece o arcabouço técnico necessário para uma possível implantação do diagnóstico peri-natal dessas condições na população brasileira.

Adicionalmente a análise dos índices hematimétricos permitiu comprovar que as mutações mais benignas do ponto de vista clínico, apresentam índices maiores de VCM e HCM e menores concentração de Hb A₂ e Hb F.

BIBLIOGRAFIA

- AMSELEM S, NUNES V, VIDAUT M. Determination of the spectrum of B-thalassemia genes in Spain by use of dot-blot analysis of amplified B-globin DNA. *Am. J. Hum. Genet.* **43**:94-100, 1988.
- ANTONARAKIS SE, ORKIIN SH, CHENG TC. B-thalassemia in American blacks: Novel mutations in the TATA box and IVS-2 acceptor splice site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:1154-1158, 1984.
- AZEVEDO ES, SILVA KMC, SILVA MCBO, LIMA AMUM, FORTUNA CMM, SANTOS MG. Genetic and Anthropological studies in the Island of Itaparica, Bahia, Brazil. *Hum. Hered.* **31**:353-357, 1981.
- BANK A. The thalassemia syndromes. *Blood* **51**:369-384, 1978.
- BREATHNACH R, CHAMBON P. Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **50**:349-383, 1981.
- CAO A, PINTUS I, LECCA V. Control of homozygous B-thalassemia by carrier screening and antenatal diagnosis in Sardinians. *Clin. Genet.* **26**:12-22, 1984.
- CAO A. personal communications, 1992.
- CODRINGTON JF, LI HM, KUTLAR F, GU LH, RAMACHANDRAN M, HUISMAN THJ. Observations on the level of Hb A in patients with different B-thalassemia mutations and a chain variant. *Blood* **76**:1246-1249, 1990.
- COSTA FF, TAVELLA MA, ZAGO MA. Molecular Bases of beta thalassemia in Brazil. *Blood* **76**:58a, 1990.
- DIAZ-CHICO JC, YANG KG, STOMING TA. Mild and severe B-thalassemia among homozygotes from Turkey: Identification of the types by hybridization of amplified DNA with synthetic probes. *Blood* **71**:248-251, 1988.
- EFSTRATIADIS A. The structure and evolution of the human B globin gene family. *Cell* **21**:653-688, 1980.

- ENGELKE DR, HOENER PA, COLLINS FS. Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:544-548, 1988.
- FORGET BG, BENZ EJ, WEISSMAN SM. Normal human globin gene structure and mutations causing the B-thalassemia syndromes. In: Caskey CT, White RL (eds) *Recombinat DNA applications to human disease*. Banbury Report n°14, Cold Spring Harbor Laboratory, 1983.
- FRITSCH EF, LAWN RM, MANIATIS T. Molecular cloning and characterization of the human B-like globin gene cluster. *Cell* **19**:959, 1980.
- FUCHAROEN S, FUCHAROEN G, FUCHAROEN P. A novel ochre mutation in the B-thalassemia gene of a Thai. *J. Biol. Chem.* **264**:7780-7783, 1989.
- GONZALEZ-REDONDO JH, STOMING TA, LANCLOS KD. Clinical and genetic heterogeneity in black patients with homozygous B-thalassemia from the Southeastern United States. *Blood* **72**:1007-1014, 1988.
- GOMES MPC, DA COSTA MGG, BRAGA LB, FERREIRA NTC, LOI A, PIRATSU M, CAO A. B-thalassemia mutations in the Portuguese population. *Human Genet.* **78**:13-15, 1988.
- HUISMAN THJ. Frequencies of common B-thalassaemia alleles among different populations: variability in clinical severity. *Brit. J. Haem.* **75**:454-457, 1990.
- HUISMAN THJ. The B- and δ -thalassemia repository. *Hemoglobin* **16**:237-258, 1992.
- HUANG SZ, WONG C, ANTONARAKIS SE, RO-LEIN T, LO WHY, KAZAZIAN HH Jr. The same TATA box B-thalassemia mutation in chinese and U.S. blacks: another example of independent origins of mutation. *Hum. Genet.* **74**:152-164, 1986.

- KAZAZIAN HHJr., ORKIN SH, ANTONARAKIS SE. Molecular characterization of seven B-thalassemia mutations in Asian Indias. **EMBO J.** 3:593-596, 1984.
- KAZAZIAN HHJr., ORKIN SH, MARKHAM AF. Quantification of the close association between DNA haplotypes and specific B-thalassaemia mutation in Mediterraneans. **Nature** 310:152-154, 1984.
- KAZAZIAN HHJr., DOWLING CE, WABER PG. The spectrum of B-thalassemia genes in China and Southeast Asia. **Blood** 68:964-966, 1986.
- KAZAZIAN HHJr., BOEHM CD. Molecular basis and prenatal diagnosis of B-thalassemia. **Blood** 72:1107-1116, 1988.
- KAZAZIAN HHJr. The thalassemia Syndromes: Molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. **Sem. in Hemat.** 27:209-228, 1990.
- LACY E, MANIATIS T. The nucleotide sequence of a rabbit B globin pseudogene. **Cell** 21:545-553, 1980.
- LAVER J, SHEN CKJ, MANIATIS T. The chromosomal arrangement of human γ -like globin genes: sequence homology and α -globin gene deletions. **Cell** 20:119, 1980.
- LEONCINI O. O sistema de processamento do RNA em Genética Molecular e de microorganismos in: **Os fundamentos da Engenharia Genética**. Editora Manole Ltda. SP. pg 185. 1987.
- LIEBHABER SA, GOOSSENS M, POON RR, KAN YM. The primary structure of the γ -globin gene cloned from normal human DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 77:7054-7058, 1980.
- LITTLE PFR, CURTIS P, CONTELLE C, VAN DEN BERG J, DALGLEISH R, MALCOLM S, COURTNEY M, WESTAWAY D, WILLIAMSON R. Isolation and partial sequence of recombinant plasmids containing human β , B or α globin cDNA fragments. **Nature** 273:640-643, 1979.

- MAGGIO A, DI MARZO R, GIAMBONA A, ACUTO S, LO GIOCO P, D'ALCAMO E, DI TRAPANI F, MARINO M, ABATE I, SAMMARCO P, KAZAZIAN HH Jr. B-thalassemia mutations in Sicily. *Ann. New York Acad. Sc.* **612**:67-72, 1990.
- MAQUAT LE, KINNIBURGH AJ, RACHMILEWITZ EA, ROSS J. Unstable B globin mRNA in mRNA deficient B thalassemia. *Cell* **27**:543-553, 1981.
- MICHELSON AM, ORKIN SH. The 3'untranslated regions of the duplicated human like globin genes are unexpectedly divergent. *Cell* **22**:371-377, 1980.
- MULLIS KB, FALOONA F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed reaction. *Methods Enzym.* **155**:335-350, 1987.
- NOVELLETTO A, HAFEZ M, DEIDDA G, DI RENZO A, FELECETTI L, EL-TAHAN H, MORSI ZE, EL ZINY M, AL-TONBARY Y, SITTEN A, TERRENATO L. Molecular characterization of B-thalassemia mutations in Egypt. *Hum. Genet.* **85**:272-274, 1990.
- ORKIN SH, KAZAZIAN HH Jr., ANTONARAKIS SE, OSTRER H, GOFF SC, SEXTON JP. Abnormal RNA processing due to the exon mutation of the B-globin gene. *Nature* **300**:768, 1982.
- ORKIN SH, KAZAZIAN HH Jr. The mutation and polymorphism of the human B-globin gene and its surrounding DNA. *Ann. Rev. Genet.* **18**:131-171, 1984.
- PADGETT RA, KONARSKA MM, GRABOWSKI PJ. Lariat RNAs as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science* **225**:898-903, 1984.
- RAMALHO AS. Investigação genético epidemiológica das talassemias beta e delta-beta no estado de São Paulo. *Rev. Paul. Med.* **88**:68, 1976.
- RAMALHO AS, MAGNA LA, COSTA FF, GROTTO HZ. Talassemia menor: um problema de saúde pública no Brazil? *Rev. Bras. Genet.* **VIII 4**:747-754, 1985.

- ROSATELLI C, LEONI GB, TUVERI T, SCALAS MT, MOSCA A, GALANELLO R, GASPERINI D, CAO A. Heterozygous B-thalassemia relationship between the hematological phenotype and the type of B thalassemia mutation. *Am. J. Hemat.* **39**:1-4, 1992.
- RUND D, FILON D, RACHMILEWITZ EA. Molecular analysis of B-thalassemia in Kurdish Jews: novel mutations and expression studies. *Blood* **74**:821a, 1989.
- RUND D, FILON D, STRAUSS N, RACHMILEWITZ A, OPPENHENN A. Mean corpuscular volume of heterozygotes of B-thalassemia correlates with the severity of mutations. *Blood* **79**:238-243, 1992.
- SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350-1354, 1985.
- SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUSHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491, 1988.
- SALDANHA PH. Efeito da migração sobre a estrutura genética de uma comunidade paulista. *Boletim nº248. Universidade de São Paulo*. 226 pg. 1968.
- SHAPIRO MB, SENAPATHY P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes. Sequence statistic and functional implications in gene expression. *Nucl. Acids. Res.* **15**:7155-7174, 1987.
- SONATI MF, FARAH SB, RAMALHO AS, COSTA FF. High prevalence of α -thalassemia in a black population of Brazil. *Hemoglobin* **15**:301-311, 1991a.
- SONATI MF, KIMURA EM, GROTTO HZW, COSTA FF. Hemoglobinopatias hereditárias em uma população hospitalar. *XIII Congresso Nacional do Colégio Brasileiro de Hematologia*. 111P. 1991b.

- SPRITZ RA, JAGADEESWARAN P, CHOUDARY PV, BIRO PA, ELDER JT, DE RIEL JK, MANLEY JL, FORGET BG, WEISSMAN SM. Base substitution in an intervening sequence of a B⁺ thalassemic human gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:2455, 1981.
- TAMAGNINI G, RIBEIRO ML, KAEDA J, GONÇALVES P, REBELO U. Genotype of B thalassaemia major and intermédia in Portugal. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* **33**:412, 1991.
- THEIN SL, OLD JM, FIORELLI G, WEATHERALL DJ. Feasibility of prenatal diagnosis of B-thalassaemia with synthetic DNA probes in two Mediterranean populations. *The Lancet* **ii**:345-347, 1985.
- THEIN SL, HESKETH C, WEATHERALL DJ. The molecular basis of B-thalassaemia in UK Asian Indians: Applications to prenatal diagnosis. *Br. J. Haematol.* **70**:225-231, 1988.
- TILGHMAN SM, TIEMEIER DC, SEIDMAN JG, PETERLIN BM, SULLIVAN M, MARZEL JV, LEDER P. Intervening sequences of DNA identified in the structural portion of the mouse B-globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**:725, 1978.
- TREISSMAN T, ORKIN SH, MANIATIS. Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned B thalassaemic genes. *Nature* **302**:591-596, 1983.
- ZAGO MA, COSTA FF, BOTURA C. Beta-thalassaemia in Brazil. *Rev. Pesq. Med. Biol.* **14**:383, 1981.
- ZHANG JZ, CAI SP, HE X. Molecular basis of B-thalassaemia in South China: Strategy for DNA analysis. *Hum. Genet.* **78**:37-40, 1988.
- WESTAWAY D, WILLIAMSON R. An intron nucleotide sequence variant in a cloned B⁺ thalassaemia globin gene. *Nucl. Acids res.* **9**:1777, 1981.
- W.H.O. -Possible indicators for considerations on planning and establishment of genetic services. WHO Advisory group on Hereditary Diseases, Geneva, 1985.

-WONG C, DOWLING CE, SAIKI RK. Characterization of B-thalassaemic mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. **Nature** 330:384-3386, 1987.

ANEXO

 MUTAÇÕES QUE CAUSAM TALASSEMIA BETA

MUTAÇÕES TIPO GRUPO ÉTNICO

região promotora

-101 (C-T)	+	Turcos, Bulgaros e Italianos
- 92 (C-T)	+	Mediterrâneos
- 88 (C-T)	+	Negros americanos e asiáticos
- 88 (C-A)	+	"Kurdish"
- 87 (C-G)	+	Mediterrâneos
- 87 (C-T)	+	Ingleses e Italianos
- 87 (C-A)	+	Iugoslavos e negros americanos
- 86 (C-G)	+	Libaneses
- 86 (C-A)	+	Italianos
- 32 (C-A)	+	"Taiwaneses"
- 31 (A-G)	+	Japoneses
- 30 (T-A)	+	Turcos
- 30 (T-C)	+	Chineses
- 29 (A-G)	+	Chineses e negros americanos
- 28 (A-C)	+	"Kurdish"
- 28 (A-G)	+	Chineses
+ 22 (G-A)	+	Turcos, Bulgaros e Italianos
+ 43 a +40 (-AAAC)	+	Chineses

Metabolismo do RNA

a-junção exon-intron

IVSI-1 (G-A)	0	Mediterrâneos
IVSI-1 (G-T)	0	Asiáticos e Chineses
IVSII-1 (G-A)	0	Mediterr., negros amer. e tunisianos
IVSI-2 (T-G)	0	Tunisianos
IVSI-2 (T-C)	0	negros americanos
IVSI-2 (T-A)	0	Algerianos
IVSI, 17nt del(3'final)	0	Kuwaitianos
IVSI, 25nt del(3'final)	0	Asiaáticos
IVSI-130 (G-C)	0	Turcos e Japoneses
IVSI-130 (G-A)	0	Egipcios
IVSII-849 (A-G)	0	Negros americanos
IVSII-849 (A-C)	0	Negros americanos

b-sequências de consenso

IVSI-5 (G-C)	+	Asiáticos, Chineses e Melaneses
IVSI-5 (G-T)	+	Mediterrâneos e negros americanos
IVSI-5 (G-A)	+	Algerianos e Mediterrâneos
IVSI-6 (T-C)	+	Mediterrâneos
IVSI, -1 (G-C) (CD 30)	+	Tunisianos e negros americanos
IVSI, -1 (G-A) (CD 30)	?	Bulgaros
IVSI, -3 (C-T) (CD 29)	?	Libaneses
IVSI-128 (T-G)	+	Arabes
IVSII-837 (T-G)	?	Asiáticos
IVSII-843 (T-G)	+	Algerianos
IVSII-844 (C-G)	+	Italianos
IVSII-848 (C-A)	+	Negros amer., egpcios e iranianos
IVSII-848 (C-G)	+	Japoneses

IVSII-850 (G-C)	0	Iugoslavos
IVSII-850 (-G)	0	Italianos
c-interior do íntron criando sítio alternativo de clivagem		
IVSI-110 (G-A)	+	Mediterrâneos
IVSI-116 (T-G)	0	Mediterrâneos
IVSII-4,5 (-AG)	+	Portugueses
IVSII-654 (C-T)	+	Chineses
IVSII-705 (T-C)	+	Mediterrâneos
IVSII-745 (C-G)	+	Mediterrâneos
d-sítio alternativo de clivagem		
CD 19 (A-G)(Hb Malay)	+	Malasianos
CD 24 (T-A)	+	Negros americanos e japoneses
CD 26 (G-A)(Hb E)	+	Asiáticos
CD 27 (G-T)(Hb Knossos)	+	Mediterrâneos
Códon sem sentido "nonsense"		

CD 15 (G-A)	0	Asiáticos
CD 15 (G-A)	0	Portugueses
CD 17 (A-T)	0	Chineses
CD 22 (G-T)	0	Ilhas reunidas
CD 26 (G-T)	0	Tailândia
CD 35 (C-A)	0	Tailândia
CD 37 (G-A)	0	Arabes
CD 39 (C-T)	0	Mediterrâneos
CD 43 (G-T)	0	Chineses
CD 61 (A-T)	0	Negros
CD 90 (G-T)	0	Japoneses

CD 121 (G-T)	0	Poloneses, franceses, sulcos, japon.
CD 127 (C-T)	0	Inglese
mudam a fase de leitura "frameshift"		

CD 1 (-G)	0	Mediterrâneos
CD 5 (-CT)	0	Mediterrâneos
CD 6 (-A)	0	Mediterrâneos e negros americanos
CD 8 (-AA)	0	Mediterrâneos
CDs8/9 (+G)	0	Asiáticos
CDs9/10 (+C)	0	Turcos
CD 11 (-T)	0	Mexicanos
CDs14/15 (+G)	0	Chineses
CD 15 (-T)	0	Asiáticos e Tailandeses
CD 16 (-C)	0	Asiáticos
CD 24 (-G, +CAC)	0	Egpcios
CDs25/26 (+T)	0	Tunisianos
CDs27/28 (+C)	0	Chineses
CD 35 (-C)	0	Malásia
CDs36/37 (-T)	0	Iranianos
CDs37/38/39 (-GACCCAG)	0	Turcos
CDs38/39 (-C)	0	Tchecoslováquia
CD 41 (-C)	0	Tailandeses
CDs41/42 (-TTCT)	0	Chineses
CD 44 (-C)	0	"Kurdish"
CD 47 (+A)	0	Suriname
CD 54 (+G)	0	Japoneses
CD 64 (-G)	0	Sulcos

CD 71 (+T)	0	Chineses
CDs71/72 (+A)	0	Chineses
CDs74/75 (-C)	0	Turcos
CD 76 (-C)	0	Italianos
CDs82/83 (-G)	0	Tchecoslováquia
CD 88 (+T)	0	Asiáticos
CD 95 (+A)	0	Tailândia
CDs106/107 (+G)	0	Negros americanos
CDs109/110 (-G)	+	Lituania

Sítio de clivagem e poliadenilação

AATAAA-AACAAA	+	Negros americanos
AATAAA-AATAAG	+	"Kurdish"
AATAAA-AATGAA	+	Malásia
AATAAA-A(-AATAA)	+	Arabes
AATAAA-AAAA(-AT)	+	Franceses

Sítio "CAP"

+1 (A-C)	+	Asiáticos
3'UTR(+1570bp)(T-C)	+	Israel
3'UTR(term. CD+6, C-G)	+	Grécia

Códon de Iniciação

ATG-ACG	0	Yugoslávia
ATG-AGG	0	Chineses, japoneses e coreanos
ATG-GTG	0	Japoneses

Globinas Instáveis

CD 60 (GTG-GAG) -	Italianos
CD 94 (+TG)(Hb Agnana) -	Italianos
CD 110 (T-C)(Hb Showa-Yakushiiji)	Japoneses
CD 114 (-CT+G)(Hb Geneva)	Franceses e Suíços
CD 123 (-A)(Hb Makabe)	Japoneses
Cds 123/125 (-ACCCACC) 0	Thailândia
CD 126 (-T) (Hb Vercelli)	Italianos
CD 127 (GLn-Pro)(Hb Houston)	Ingleses
CD 127 (CAG-CGG) -	Franceses
CDs127/128(-AGG)(Hb Gunma)	Japoneses
CDs128/129(-4,+5)(-GCTG,+CCACA) e	
Cds132/135(-11)(-AAAGTGCTGGC)	Israel
Cds134/137(-10,+4) 0	Portugueses
Deleções	
12.6 Kb	Alemães
>200 Kb	Israelenses
619 bp	Asiáticos
1393 bp	Negros, ingleses, alemães, anglo-saxões
1605 bp (-985 a +621)	Yugoslavos
4237 bp	Tchecoslováquia
290 bp	Turcos e jordanianos
44 nt	Gregos
-3400 bp	Thailândia
532 bp	Negros americanos