



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PROPE

MARIANA SCHWENGBER RABELO

***CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HEMOGLOBINAS S, C E
BETA TALASSEMIAS EM PACIENTES DO LABORATÓRIO
CLÍNICO DA PUC-GOIÁS***

GOIÂNIA

2014



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PROPE
Mestrado em Genética

MARIANA SCHWENGBER RABELO

***CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HEMOGLOBINOPATIAS
EM PACIENTES DO LABORATÓRIO CLÍNICO DA PUC-GOIÁS***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Genética da Pontifícia Universidade, Católica de Goiás para obtenção do Grau de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. KÁTIA KARINA VEROLLI DE O. MOURA
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. KARLLA GREICK BATISTA DIAS PENNA

GOIÂNIA

2014

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)
(Sistema de Bibliotecas PUC Goiás)

R114c Rabelo, Mariana Schwengber.
Caracterização molecular de hemoglobinas s, c e beta
talassemias em pacientes do laboratório clínico da PUC-Goiás
[manuscrito] / Mariana Schwengber Rabelo – Goiânia, 2014.
46 f. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica
de Goiás, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em
Genética.

“Orientadora: Profa. Dra. Kátia Karina Verolli O Moura”.
Bibliografia.

1. Hemoglobinopatia. 2. Talassemia. 3. Reação em cadeia
de polimerase. I. Título.

CDU 616.155.16(043)

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. KÁTIA KARINA VEROLLI DE O. MOURA
(Orientador)

Prof^a. Dr^a. KARLLA GREICK BATISTA DIAS PENNA
(Co-orientador)

Prof^o. Dr. Paulo Roberto Melo Reis
(Membro Interno)

Dr. Fernando Antônio Vinhal
(Membro Externo)

Prof^a. Dr^a. Flávia Rodrigues
(Suplente)

DEDICATÓRIA

Agradeço a Deus, pois sem ele eu não teria forças para essa longa jornada. Foram dois anos de trabalho intenso, os anos mais intensos da minha vida e com certeza mais importantes. Ganhei um filho tão desejado e tão amado, um príncipe que ganhou asas e foi morar junto de Deus tão cedo, deixando um grande vazio físico, mas me deixou mais forte, determinada e cada vez mais apaixonada por ele. Meu pequeno anjo Rafael, dedico a você esse trabalho, você fez parte de cada detalhe na barriga da mamãe. Dos dias que ficamos pipetando inúmeros tubos, correndo géis, escrevendo, lendo e aprendendo juntos, eu brincava que você nasceria sabendo tudo de hemoglobinopatias. Me pergunto de onde tirei forças para continuar e terminar minha dissertação, mas logo sinto você me dando forças e iluminando meu caminho. Não posso tê-lo fisicamente, mas você mora dentro de mim, no meu coração e pensamento. Meu primeiro filho, meu príncipe de asas, meu amorzinho.

Dedico este trabalho a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia. Nos momentos mais difíceis onde tudo pareceu perder o sentido, solidifiquei minha fé em Deus, Ele segurou minha mão e caminhamos juntos, dia-a-dia.

Aos meus pais, irmã, cunhado e afilhado que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida, nunca desistindo de mim, mesmo quando eu mesma desistia.

Agradeço também ao meu esposo, Paulo Vitor, que de uma forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades e comemorando comigo as vitórias. As dificuldades da vida nos mostram que quando escolhemos um marido, ganhamos um amigo, companheiro, pai, conselheiro para todas as horas. Frente a todos os desafios da vida, olho para você e vejo o quanto Deus me deu uma pessoa maravilhosa. Te escolhi para ser pai do Rafael, o melhor pai desse mundo, que amou e lutou com todas as forças pelo nosso pequeno, e hoje compartilha comigo a mesma saudade e amor eterno por ele.

À professora Kátia, pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desse trabalho. Em muitos momentos além de orientadora foi amiga/mãe, vivendo comigo meu momento de dor e saudade, secando minhas lágrimas e me motivando a terminar. Carrego para a vida não só como orientadora de mestrado, mas como uma amiga que fez parte dos momentos mais importantes da minha vida.

À professora Karlla, pelo convívio, pelo apoio, pela compreensão e pela amizade.

"Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados." **(Mahatma Gandhi)**

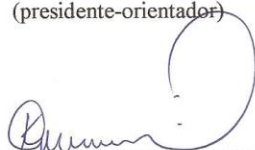
ATA COMPLEMENTAR Nº 95/2014

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
DISCENTE: MARIANA SCHWENGBER RABELO
DEFENDIDA EM 09 DE OUTUBRO DE 2014 APROVADA **COM CONCEITO** A

BANCA EXAMINADORA



.....
Prof.ª. Dra. Katia Karina Verolli de O Moura / PUC Goiás
(presidente-orientador)



.....
Prof.ª. Dra. Karlla Greick Batista Dias Penna
(Co-orientadora)



.....
Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis
(membro interno)



.....
Prof. Dr. Fernando Antônio Vinhal dos Santos / UFU
(membro externo)

SUMÁRIO

Resumo em português	6
Resumo em inglês	7
Lista de figuras	8
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	9
INTRODUÇÃO.....	10
1. Estudo das hemoglobinopatias e talassemias.....	11
Hemoglobinas variantes, talassemias e interações.....	15
Hemoglobina S e interações.....	15
Hemoglobina C e interações.....	17
Hemoglobina D e interações.....	18
Talassemias.....	19
Talassemias do tipo beta e interações	19
Talassemias do tipo alfa	20
OBJETIVOS	22
CASUÍSTICA E METODOLOGIA	23
1.Casuística	23
2.Metodologia	23
2.1 Extração e quantificação do DNA genômico.....	24
2.2 Amplificação do DNA genômico.....	24
2.3 Identificação dos genótipos AA, AS, SS, AC, CC e SC	24
2.4 Identificação dos genótipos IVS I-6 e IVS I-110	25
2.7 Identificação dos genótipos IVS I-1 e CD 39	25
2.8 Sequencias nucleotídicas dos primers utilizados nas reações em cadeia da polimerase	26
RESULTADOS	27
DISCUSSÃO	29
CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

RESUMO

As hemoglobinopatias formam um grupo de alterações hereditárias prevalentes em várias regiões do mundo, mas atingem significativamente a população brasileira por sua miscigenação abundante. São alterações em genes estruturais, que ocasionam a formação de hemoglobinas variantes, e/ou em genes reguladores, causando as talassemias. Atualmente, o número de hemoglobinas anormais identificadas tem aumentado devido à melhoria nas metodologias de análises, no entanto, muitos laboratórios de rotina não estão preparados para a correta identificação destas alterações. No presente estudo objetivamos avaliar a prevalência das hemoglobinopatias por meio de métodos clássicos e fazer a caracterização molecular das mutações S, C, beta talassemia IVS-110, IVS-1, IVS-6 e CD-39 pela amplificação gênica utilizando a técnica do PCR-AE. O estudo molecular utilizou *primers* específicos que se ligam pontualmente na posição do alelo mutado e na respectiva posição do alelo normal, podendo assim realizar amplificação gênica alelo específica. Foram coletadas 200 amostras de sangue periférico de pacientes do Laboratório Clínico da PUC-Goiás no período de julho/2012 a dezembro/2012. Os resultados evidenciaram a validade da metodologia molecular na caracterização das mutações, sendo observados dois pacientes (1%) AC, um (0,5%) AS, dois (1%) com mutação IVS-6 e um (0,5%) IVS-6. O códon 39 e IVS-110 não foram detectados em nenhum dos pacientes investigados.

Palavras-chave: Hemoglobinopatias, Talassemias, PCR.

ABSTRACT

The hemoglobinopathies are a group of heritable changes prevalent in various regions of the world, but significantly affect the Brazilian population for its abundant miscegenation. Are changes in structural genes that cause the formation of hemoglobin variants, and / or regulatory genes, causing thalasseмии. Currently, the number of identified abnormal hemoglobin has increased due to improvements in methods of analysis, however, many routine laboratories are not prepared for the correct identification of these changes. In the present study aimed to assess the prevalence of hemoglobinopathies using classical methods and make the molecular characterization of mutations S, C, beta thalasseμία IVS-110, IVS-1, IVS-6 and CD-39 by gene amplification using the PCR technique (Polymerase Chain Reaction). The molecular study used specific primers that bind promptly at the position of the mutated allele in position and the normal allele can thereby carry out gene allele specific amplification. 200 peripheral blood samples of patients of the Clinical Laboratory at PUC-Goiás were collected during July / December 2012/2012. The results showed the validity of the methodology in the molecular characterization of mutations, two (1%) AC patients, an one (0,5%) AS, two (1%) with mutation IVS-6 and one (0,5%) IVS-1 observed. The codon 39 and IVS-110 were not detected in any of the patients investigated.

Keywords : Hemoglobinopathies, Thalasseмии, PCR .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da localização dos primers no gene da globina beta humana na caracterização molecular das hemoglobinas S, C e interações.....	16
Figura 2: Hemoglobina A e hemoglobina S. Substituição do ácido glutâmico pela valina	20
Figura 3: A e hemoglobina C. Substituição do ácido glutâmico pela lisina.....	21
Figura 4: Hemoglobina A e hemoglobina D. Substituição do ácido glutâmico pela glutamina.....	22
Figura 5: Cromatograma de hemoglobina por técnica de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).....	34
Figura 6: PCR alelo específica para identificação dos genótipos AA e AS.....	35
Figura 7: PCR alelo específica para identificação dos genótipos AA e AC.....	36
Figura 8: PCR alelo específica para identificação dos genótipos IVS I-110.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de referência.....	29
Tabela 2: Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> utilizados nas reações em cadeia da polimerase.....	31
Tabela 3: Pacientes fora e adequados ao valor de referência.....	33
Tabela 4: Faixa etária dos pacientes.....	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Alterações no eritrograma.....	33
Gráfico 2: Alterações por HPLC	34
Gráfico 3: Grupos Étnicos.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a+ = alfa mais

a0 = alfa zero

b+ = beta mais

b0 = beta zero

CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média

CpG= Citosina fosfato guanina

DNA = ácido desoxiribonucleico

EDTA = etilenodiaminotetracético

F= Fetal

Fe++ = estado reduzido ou ferroso

Hb = hemoglobina

HCM = hemoglobina corpuscular média

HPLC = cromatografia líquida de alta performance

HSS = locais de hipersensibilidade

IgG = Imunoglobulina G

IgM = Imunoglobulina M

Kb = Kilobases

LCR = região controladora do locus

NF-E2 = Fator nuclear eritróide 2

PCR = reação em cadeia da polimerase

PHHF = persistência hereditária de hemoglobina fetal

RDW = índice de anisocitose

RNAm = ácido ribonucleico mensageiro

Tm = temperatura de melting

VCM = volume corpuscular médio

α = alfa

β = beta

δ = Delta

ε = Épsilon

INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias são um tipo de distúrbios hereditários recessivos compostos por talassemias e Hb variantes. As mutações ocorrem em regiões específicas e frequentemente são originadas por distribuições étnicas e geográficas, justificando os programas de controle destas mutações e o aconselhamento genético. As mutações podem ser diagnosticadas por diversos métodos, porém o método de escolha envolve cuidados com a metodologia aplicada e o grupo populacional que será estudado. A população brasileira caracteriza-se por apresentar heterogeneidade genética ampla, refletindo nos polimorfismos de hemoglobinas (CHINELATO-FERNANDES; BONINI-DOMINGOS, 2005).

As hemoglobinopatias podem ser reflexo de mutações que afetam os genes reguladores, causando um desequilíbrio no conteúdo quantitativo das cadeias polipeptídicas, conseqüentemente nos tipos normais de Hb causando as talassemias, ou, ainda, de alterações envolvendo genes estruturais que causam a formação de moléculas de Hb com características bioquímicas diferentes das Hb normais, também denominadas Hb variantes (ONDEI; ZAMARO; BONINI-DOMINGOS, 2005).

O número de Hb variantes descritas na literatura tem aumentado significativamente. Já foram catalogadas 1.194 Hb variantes no *Hemoglobin Variant Data Base* (Acesso em 24/09/2014). A maior parte delas é causada por substituições de aminoácidos, resultantes de mudanças nas sequências de nucleotídeos (CHINELATO-FERNANDES; BONINI-DOMINGOS, 2006). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 5% da população mundial seja portadora de algum tipo de anemia hereditária (FERREIRA, 2012).

A população brasileira exhibe genes para as hemoglobinas variantes com variáveis frequências e influenciadas por seus grupos étnicos constituidores. Então, o diagnóstico desses portadores de alterações genéticas é de valia para a saúde pública, pois representam a origem de novos heterozigotos e de possíveis homozigotos. A contenção das hemoglobinopatias tem sido possibilitada por meio do aconselhamento genético e diagnóstico precoce, com acompanhamento clínico dos homozigotos, o esclarecimento dos heterozigotos, principalmente dos casais de risco, pode contribuir para evitar o nascimento de crianças portadoras de uma patologia genética, podendo ser letal (CHINELATO-FERNANDES; BONINI-DOMINGOS, 2006. VIANA-BARACIOLLI, 2001).

O diagnóstico dessas variantes tem sido realizado por várias metodologias, porém a experiência laboratorial deixa clara a falta de uma resolução suficiente para a correta caracterização, confirmação da mutação e o estabelecimento de um protocolo de acompanhamento dos portadores nas metodologias mais empregadas na rotina laboratorial. A introdução de metodologia molecular pode contribuir o fato de forma segura e acertada, caracterizando o tipo de mutação responsável pela patologia. Os testes de triagem, isoladamente, não são específicos para quaisquer hemoglobinopatias; porém, juntos, podem ajudar no diagnóstico da alteração e direcionamento dos procedimentos posteriores, auxiliando na compressão dos processos fisiopatológicos relacionados ao distúrbio genético em questão (CHINELATO-FERNANDES; BONINI-DOMINGOS, 2006).

1. Estudo das hemoglobinas variantes e talassemias

Milhares de pessoas no mundo portam, em seu patrimônio genético, hemoglobinas anormais em diferentes combinações, com consequências que oscilam de praticamente imperceptíveis às letais. O diagnóstico correto e classificação têm grande importância para a genética e bioquímica. O contínuo avanço que vem sendo obtido em genética a respeito das alterações que desencadeiam doenças hereditárias exigem novas estratégias e métodos para detecção das mutações. A ampla heterogeneidade molecular e os diversos locus de mutação em cada gene causavam sérias limitações nas pesquisas até pouco tempo atrás. Com a implantação da tecnologia de DNA recombinante e PCR (Reação em cadeia da polimerase), subsídios para a resolução destes problemas aumentou. Hoje, mutações de um determinado gene específico podem ser detectadas por hibridização e amplificação do alelo específico (LEONELI *et al*, 2000).

A hemoglobina é uma proteína composta por quatro globinas, associadas a grupos heme, constituído por um átomo de ferro em uma estrutura porfírica. A Hemoglobina possui quatro cadeias polipeptídicas, uma alfa e outra beta. Os genes da globina alfa estão arranjados no cromossomo 16, e os genes da beta globina, no cromossomo 11. Cada um dos genes do *cluster* da globina pode ser sequenciado, e estabelecida a sua estrutura, além de um número de sequencias regulatórias importantes definidas.

A análise da expressão gênica da hemoglobina do eucarioto é possibilitado pelo uso do locus da Beta globina, um complexo sistema gênico. O locus é formado por cinco genes funcionais da beta globina, ϵ , $\zeta\gamma$, $\alpha\gamma$, δ , e β , organizados no cromossomo

em ordem de expressão durante a ontogenia. A regulação da expressão genica é controlada, em parte, pela região de controle do locus. Durante a ontogenia dois *switches* ocorrem na expressão do gene da β -globina que implicam na mudança de requisitos por oxigênio no feto (CHINELATO-FERNANDES; BONINI-DOMINGOS, 2006). O primeiro *switch* ocorre no período embriogênico, de ϵ - para fetal, γ -globina, em meados da sexta semana de gestação. O segundo *switch* ocorre do período fetal para adulto, δ - para β -globina logo após o nascimento. Novos fatores eritróides específicos de transcrição foram descobertos e o seu papel na expressão genica da estrutura da cromatina têm aumentado o entendimento do princípio de *switch* do gene da globina. A hierarquia de eventos que regulam a expressão do gene ao longo do desenvolvimento, a partir de sinalização extracelular para ativação ou repressão da transcrição, no entanto ainda é complexa (HARJU; MCQUEEN; PETERSON, 2002).

Genes do complexo gene β -globina, juntamente com os do complexo gene α -globina (HBZ2, HbA2 e HBA1) codificam o desenvolvimento especificamente de hemoglobinas nos vertebrados. A transcrição do HBBC mamífera é regulada tanto por elementos proximais, tais como promotores, e por um elemento de regulação distal, a região de controle do locus (LCR). O LCR é marcado por vários locais de hipersensibilidade (HSS) na cromatina eritróide, e é necessária para a expressão de genes dentro do HBBC em células eritróides (MOLETE *et al*, 2001. STEIMBERG *et al*, 2001).

Diversas doenças genéticas humanas aparentemente surgem pelo descontrole de citosinas em dinucleotídeos CpG metilados. A sua taxa de mutação é elevada quando C está presente como 5-metil-citosina, mas acredita-se ser normal quando não metilado. O gene da beta-globina contém dois, o gene da gama-globina cinco, e cada um dos genes alfa-globina contém 35 CpG. O CpG é metilado na beta e gama-globina, enquanto nos genes alfa-globina são baixo metilados. Esperava-se que o CpG fosse uma fonte frequente de mutações nos genes beta e gama-globina, mas não nos genes alfa-globina, de fato, as evidências apontam para CpG como uma fonte frequente de mutações em ambos os genes alfa e beta-globina. (PERTUZ, 1990. BERTHOLO; MOREIRA, 2005).

Em indivíduos adultos sem a presença de mutações, existem duas cadeias alfa e duas cadeias beta, formando a hemoglobina A1, e duas cadeias alfa e duas delta para a hemoglobina A2 (ZAMARO *et al*, 2002).

A hemoglobina fetal – Hb F é formada por duas cadeias gama e duas cadeias alfa e é característica do período fetal de desenvolvimento, tendo sua síntese diminuída no período pós-natal (ZAMARO *et al*, 2003). Em algumas alterações hereditárias, a Hb F permanece aumentada, como nas delta-beta talassemia, beta talassemia e persistência hereditária de Hb F (PHHF). A persistência da Hb F após os seis meses de idade pode ser influenciada por defeitos genéticos ligados aos genes gama, associações com algumas hemoglobinopatias ou fatores ambientais. Em adultos normais, a Hb F representa menos de 1% das hemoglobinas totais, com porcentagem média de 0,4%. O percentual de hemoglobinas normais no adulto é de Hb A: 96% – 98% e Hb A2: 2,5% – 3,5% e Hb F de 0% – 1% (ZAMARO *et al*, 2002).

A síntese da globina gama também pode ser estimulada por fatores externos como leucemias, transplantes de medula óssea, induções químicas, dentre outros. A Hb F influencia também a manifestação clínica de outras hemoglobinopatias, por sua afinidade aumentada ao oxigênio, melhorando os sintomas apresentados (ZAMARO; BONINI-DOMINGOS; HIDALGO, 2003).

As mutações envolvendo genes estruturais promovem a formação de moléculas de hemoglobinas com características bioquímicas diferentes das hemoglobinas normais, por isso são chamadas variantes, em sua maioria originada por substituições de aminoácidos, produto de mudanças nas sequências de nucleotídeos. As mutações que afetam genes reguladores promovem desequilíbrio do conteúdo quantitativo das cadeias e, conseqüentemente, dos tipos normais de hemoglobinas, causando as talassemias (ORLANDO; NAOUM; SIQUEIRA; BONINI-DOMINGOS, 2000).

A redução da atividade de uma dessas três enzimas ocasionada por herança genética autossômica recessiva pode resultar na elevação da concentração de metaemoglobina, que, ao atingir valores entre 8% e 40%, promove a mudança na cor vermelha do sangue para a cor marrom e presença de produtos de degradação da metaemoglobina no interior dos eritrócitos, os corpos de Heinz. Por fim, a metaemoglobinemia causada por alteração na molécula da hemoglobina (Hb A) em hemoglobina variante (Hb M) se deve a mutações que ocorrem nas globinas alfa, beta ou gama. A afinidade ao oxigênio pode estar reduzida ou aumentada, dependendo do tipo de Hb M. Quando a causa hereditária que deu origem à Hb M afeta a globina alfa, a cianose é observada nos primeiros dias após o nascimento do recém-nascido, enquanto nas alterações da globina beta as manifestações clínicas e laboratoriais se sucedem principalmente após o sexto mês de vida,

quando a globina gama é substituída pela globina beta mutante da Hb M (NAOUM; RADISPIEL; SIQUEIRA; BONINI-DOMINGOS, 2000).

Hemoglobinas variantes, talassemias e interações observadas na população brasileira

Hemoglobina S

A hemoglobinopatia S é a doença com maior incidência na população brasileira e no mundo. Sua etiologia é uma mutação que ocorre no gene da globina beta, que produz uma hemoglobina anormal, denominada hemoglobina S (HbS). O portador pode manifestar-se como assintomático, forma heterozigota com um único gene mutado, ou sintomático, forma homozigota com dos dois genes mutados. A precipitação da HbS tem como consequências principais a anemia hemolítica crônica e a oclusão de pequenos vasos sangüíneos, que ocasionam lesões teciduais isquêmicas com crises de dor, infartamento e necrose em diversos órgãos. A doença apresenta maior incidência em negros e pardos. Estimativas com base na prevalência admitem, no Brasil, a existência de mais de dois milhões de portadores do gene da HbS, aproximadamente oito mil afetados na forma homozigota e o nascimento de 2500 casos novos por ano (NAOUM; SOUZA, 2004).

A morbidade e a mortalidade de portadores falcêmicos têm sido relacionadas com várias situações, destacam-se: o desconhecimento da doença, a dificuldade de se proceder ao diagnóstico precoce e correto do genótipo e as deficiências do atendimento médico e dos procedimentos terapêuticos, entre outros. Entretanto, um dos fatores predisponentes ao processo hemolítico das células falciformes induzem-no às múltiplas consequências patológicas da doença falciforme devido à degradação oxidativa da Hb S. A desoxigenação da Hb S leva a sua metemoglobinização (meta-Hb S) e consequente aumento desse pigmento dentro do eritrócito. Quando a concentração de meta-Hb S supera a ação da enzima meta-Hb-redutase, é desencadeada a degradação da meta-Hb S, com formação de hemicromos ou subprodutos do grupo heme, e a precipitação da globina S, oxidada sob forma de corpos de Heinz (ZAMARO, 2002).

Durante a formação do eritrócito em forma de foice, entre os eventos bioquímicos e polimerizantes da célula, ocorre a degradação oxidativa da Hb S, com liberação de espécies ativadas de oxigênio que alteram a distribuição das moléculas de imunoglobulinas G (IgG) na superfície da membrana eritrocitária. As disposições desordenadas da molécula de IgG em determinadas regiões da célula falciforme

facilitam as ligações com os receptores Fc das células endoteliais e, dessa forma, induzem a ação fagocitária dos macrófagos no sistema retículo endotelial, causando hemólise e anemia (ZAMARO *et al*, 2002).

A causa da doença é uma mutação pontual no gene beta da globina, em que há a substituição de uma base nitrogenada do códon GAG para GTG, resultando na troca do ácido glutâmico (Glu) pela valina (Val) na posição número seis do gene. Essa substituição origina uma molécula de hemoglobina anormal denominada hemoglobina S (HbS), ao invés da hemoglobina normal chamada de hemoglobina A (HbA) (Figura 2). Ambos os genes responsáveis pela produção da cadeia beta codificam Hb S, não havendo a produção de HbA. Os heterozigotos para HbS têm um único alelo alterado. O outro gene da cadeia beta codifica uma cadeia beta normal, resultando no traço falciforme. A hemoglobina S está presente na população brasileira com prevalências variáveis, dependentes dos grupos raciais formadores de cada região (ZAMARO *et al*, 2002).

Dados da literatura mostram que o diagnóstico precoce, sobretudo ao nascimento, e o tratamento adequado, melhoram drasticamente a taxa de sobrevivência e a qualidade de vida dos doentes. Na anemia falciforme o simples esquema de vacinação contra pneumococo e *Haemophilus influenza*, acompanhado de penicilinoterapia profilática, diminui o número de mortes no período crítico, situado entre os seis meses e os três anos de idade. Porém, o diagnóstico é dificultado em algumas metodologias empregadas, como a migração eletroforética em pH alcalino, pois apresenta similaridade com outras hemoglobinas, e estudos complementares para sua correta caracterização são necessários. Em pacientes com Hb S os valores de Hb A2 estão aumentados porque quando dosados por HPLC parte das Hb S alteradas elevam o pico de A2 (GULBIS; VERTONGEN, 1999), isso torna a dosagem de Hb A2 inviável por este método, fazendo-se necessária a quantificação por outra metodologia.

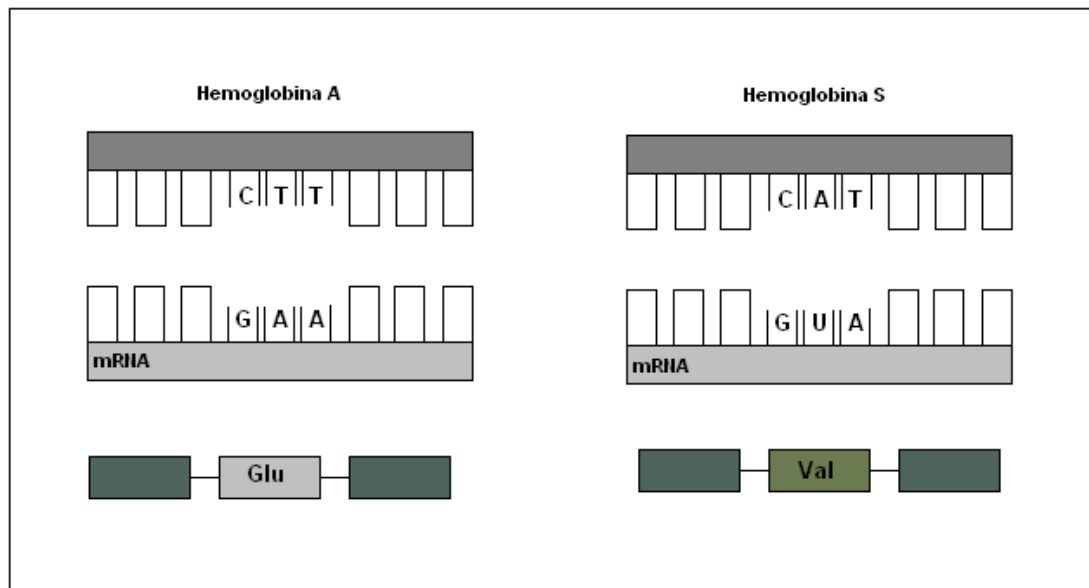


Figura 2: Representação esquemática do códon 6 onde ocorre a mutação do nucleotídeo “T” por “A”, resultado na troca do ácido glutâmico pela valina. **Fonte:** Rabelo, 2014.

Os heterozigotos do gene da hemoglobina S possuem um percentual de hemoglobina anômala que varia de 22% a 45% da hemoglobina total. Esses indivíduos apresentam, portanto, a hemoglobina S em mistura com a hemoglobina normal A (frações A e A₂), ao contrário dos homozigotos SS, que possuem quase toda a sua hemoglobina do tipo S, com pequena quantidade (1% a 3%) de hemoglobina A₂ e quantidades variáveis (0 a 30%) de hemoglobina fetal. As hemácias dos heterozigotos apresentam a capacidade de se tornarem falciformes, embora, para tanto, devam ser submetidas a menores tensões de oxigênio do que as hemácias dos pacientes homozigotos, que possuem maior potencial de falcização (PAIVA-SILVA; RAMALHO, 1997).

Os testes de solubilidade para a triagem de HbS são desaconselhados, uma vez que, estes não permitem distinguir indivíduos AS, SS ou SC. Além disso, em neonatos, estes testes costumam ser negativos devido à pequena concentração da HbS e grande quantidade de Hb fetal (DUCATTI *et al*, 2011).

Hemoglobina C

A hemoglobina variante do tipo C é um tipo de hemoglobina que desencadeia a formação de cristais no interior do eritrócito. Da mesma forma que a HbS, a HbC é característica de povos de origem africana, sendo encontrada com frequências entre 5 e 25% em muitas regiões da África (DUCATTI, 2001). Consiste na mutação do gene da globina beta no códon 6 (GAG-AAG), resultando na substituição do sexto

aminoácido da cadeia beta da hemoglobina humana, o ácido glutâmico, pelo aminoácido lisina (Figura 3) (CHINELATO-FERNANDES; BONINI-DOMINGOS, 2006).

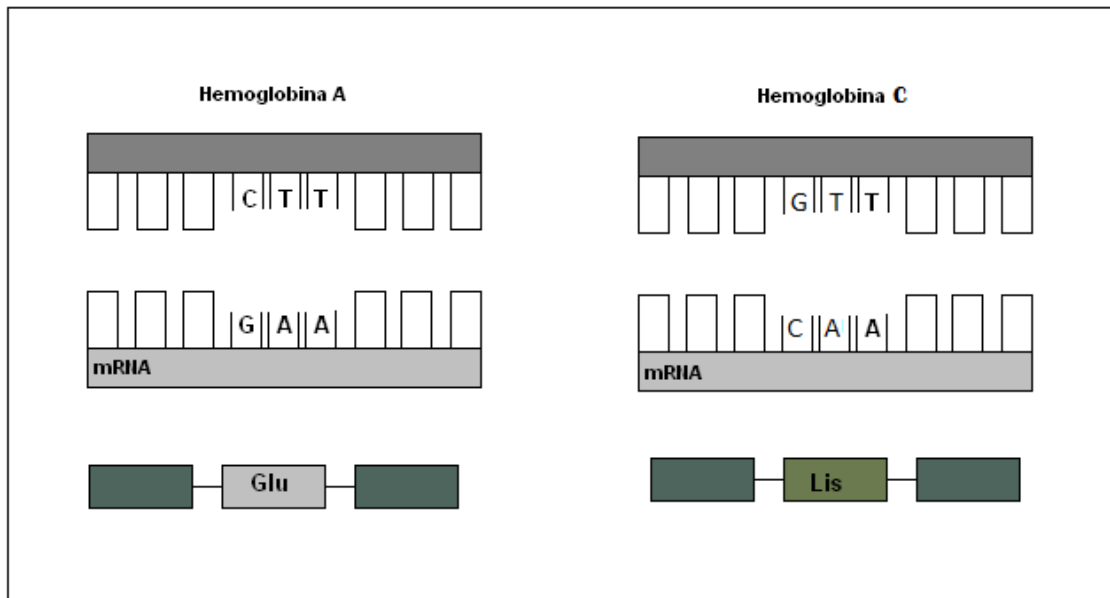


Figura 3: Representação esquemática do códon 6 onde ocorre a mutação do nucleotídeo “C” por “G”, resultado na troca do ácido glutâmico pela lisina. **Fonte:** Rabelo, 2014.

A quantificação da HbA2 é muito difícil em portadores da hemoglobina variante C, porque ambas hemoglobinas co-eluem na maioria dos métodos cromatográficos, exceto na cromatografia líquida de pressão elevada utilizando um gradiente de pH de carboximetilcelulose (CM-52) com um tampão de fosfato. Métodos eletroforéticos são ineficazes para separar hemoglobina C de HbA2 (ALMEIDA, 2011).

Hemoglobina D e interações

A Hb D é uma hemoglobina variante com mutações em diferentes pontos da globina beta, fatos que determinam pelo menos quatro tipos distintos: Hb D Iran, Hb D Ibadan, Hb D Beograd e Hb D Punjab ou Los Angeles. O tipo mais comum entre os genótipos de Hb D é a Hb D Punjab ou Los Angeles que foi descrita em 1950 por Itano e Neel. É originada de uma transversão GAA-CAA no códon 121 da globina beta; essa mutação resulta na substituição do ácido glutâmico por glutamina na proteína (Figura 4). No Brasil, em amplo estudo realizado em diversas regiões e avaliando 100 mil pessoas, foi possível avaliar que os casos de Hb D identificados eram do tipo D Punjab ou Los Angeles, com prevalência média do genótipo da Hb AD na proporção

de um caso para cinco mil pessoas analisadas (NAOUM; MORAES; RADISPIEL; CAVALHERI; VALERI, 2002).

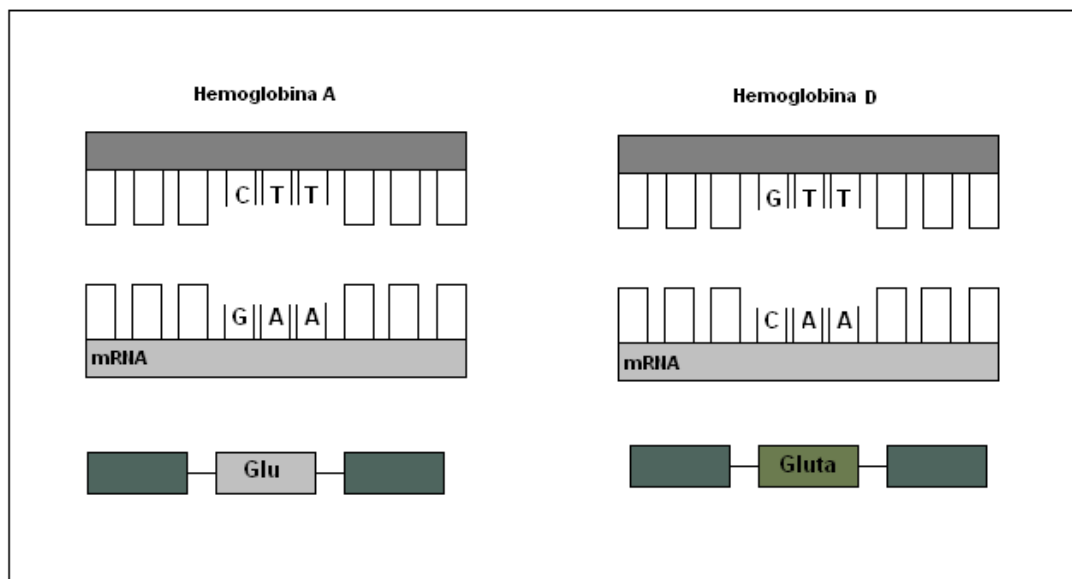


Figura 4: Representação esquemática do códon 121 onde ocorre a mutação do nucleotídeo “G” por “C”, resultado na troca do ácido glutâmico pela glutamina. **Fonte:** Rabelo, 2014.

A homozigose da Hb D, ou Hb DD, é uma situação rara, mesmo na região de Punjab (Índia) onde a prevalência do heterozigoto (Hb AD) é variável entre 2 e 3%. A Hb DD – também conhecida por doença de Hb D – se caracteriza por discreta anemia microcítica e hipocrômica, e a concentração da Hb D é próxima de 97 e 98%. A interação entre Hb D e talassemia beta também é uma situação muito rara, com poucos casos relatados na literatura internacional e também apresenta discreto grau de anemia microcítica e hipocrômica (BERTHOLO; MOREIRA, 2006).

A Hb D migra na mesma posição da Hb S em eletroforeses alcalinas, e a diferenciação entre as hemoglobinas S e D se faz por meio de eletroforese em pH ácido. O diagnóstico específico dos tipos de Hb D pode ser efetuada por eletroforeses de isofocalização e de cadeias polipeptídicas de globinas, PCR e HPLC. Porém, o HPLC apresenta limitações quando utilizando o método de troca catiônica. Em paciente com HbD os valores de A2 estão baixos, e aHb A2 pode estar eluindo no pico de A ou D (DUCATTI *et al*, 2011).

Talasseмииas

As síndromes talassêmicas compreendem um grupo heterogêneo de distúrbios genéticos, caracterizados pela ausência ou redução na síntese de cadeia globínica. A

talassemia beta caracteriza-se pela síntese deficiente de cadeia beta e a talassemia alfa, pela diminuição na síntese de globina alfa. Nas formas sintomáticas, as talassemias se apresentam como anemia hemolítica crônica e são, muitas vezes, fatais na infância (TALMACI *et al*, 2004).

Tipo beta e interações

A talassemia β pode ser definida como uma síndrome de hemoglobinopatias hereditárias caracterizadas por uma deficiência quantitativa das cadeias de β globina funcionais. Apesar de ser definida como uma redução na síntese de globina β , algumas formas resultam de variantes de hemoglobina estruturais que são sintetizados de forma ineficaz ou são tão instáveis que resultam em uma deficiência funcional das cadeias β e um fenótipo talassêmico (THEIN, 2004).

Portadores de talassemia β podem ser clinicamente assintomáticos, eles podem ter uma anemia ligeira com hipocrômicos microcíticos glóbulos vermelhos característicos, níveis elevados de HbA2 e variável de Hb F. No entanto, mesmo os estados heterozigóticos para a talassemia β mostram uma diversidade fenotípica comparável com aquela de talassemia maior. Em alguns casos, o alelo para talassemia β pode ser fenotipicamente "silencioso", sem anemia ou quaisquer alterações hematológicas. Já em outros casos, o estado heterozigótico provoca um fenótipo quase tão grave quanto formas principais, isto é, quando o alelo β talassêmico é herdado predominantemente (NAOUM, 2007).

Os alelos da talassemia β podem ser classificados como β^0 ou β^+ refletindo o fenótipo resultante. Na talassemia β^0 , existe uma ausência completa da produção de globina β e corresponde à talassemia mais severa, já na β^+ em que há alguma, embora reduzida produção de globina β . Talassemia β intermediária, por vezes referida como β^{++} , permite que uma quantidade moderada de globina β seja produzida, enquanto na 'silenciosa' β talassemia, o déficit na produção da cadeia β é mínimo, e a diminuição de glóbulos vermelhos é normal e os níveis de HbA2 são normais (BONINI-DOMINGOS, 2004).

As mutações pontuais que causam β talassemia, resultado de substituições de bases únicas, causadas por pequenas inserções ou deleções de algumas bases no gene ou em sequências flanqueadoras, podem afetar o nível de regulação genética. Mutações que afetam o processamento de RNA podem envolver qualquer uma dos dinucleotídeos invariantes, em que o splicing normal é totalmente abolido com o fenótipo resultante de β^0 talassemia (ZAMARO *et al*, 2003).

Em 90% dos portadores de talassemia beta menor, a concentração da Hb A2 apresenta-se elevada (4%-7%), com eritrograma composto por eritrocitose em relação ao hematócrito, índices VCM e HCM reduzidos, morfologia eritrocitária com presença de micrócitos, esquisócitos, dacriócitos, hipocromia e pontilhados basófilos. A principal dificuldade no diagnóstico ocorre pela concentração "normal" de Hb A2 decorrente da associação com anemia ferropênica – a baixa concentração de ferro interfere na síntese de globina delta, diminuindo a síntese da Hb A2 (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 2007).

Alta concentração de Hb A2 em indivíduos maláricos e o aumento desta fração hemoglobínica pode facilmente sugerir resultados falso-positivos para o diagnóstico de beta talassemia menor, já que a Hb A2 representa um grande referencial para a confirmação dessa patologia (OLATUNJI *et al*, 2003).

Outra dificuldade de diagnóstico é enfrentada quando existe a interação da talassemia beta menor com talassemia alfa, fato que diminui o desequilíbrio entre globinas alfa e beta e, por essa razão, a Hb A2 pode-se apresentar em níveis normais e a Hb H tornar-se visualmente imperceptível. Há casos em que o portador de talassemia beta menor apresenta aumento das concentrações de Hb A2 e de Hb fetal (2% a 5%), ou então com nível normal de Hb A2 e Hb fetal elevada (2% a 5%) (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 2007).

Laboratorialmente, o paciente com talassemia beta maior apresenta anemia grave com exuberante alteração da morfologia eritrocitária. A análise eletroforética revela elevada concentração de Hb Fetal entre 20% e 100% dependendo do tipo genético da talassemia beta (FONSECA *et al*, 1998).

Estudos moleculares mostram a alta frequência de mutantes do Mediterrâneo, como a mutação CD39. No mesmo estudo, com amostras da região Nordeste, observou-se uma alta frequência de uma mutação que raramente foi observada na população do sudeste, a mutação IVS1-6 (ROCHA *et al*, 2010).

Talasseмии do tipo alfa e interações

A talassemia alfa é a doença com maior frequência de herdabilidade no mundo, incluindo a população brasileira, afetando principalmente os descendentes asiáticos e alguns grupos africanos. Por volta de 10 anos atrás, devido aos métodos de diagnósticos inadequados, a frequência de alfa talassemia foi subestimada. Alguns estudos mostram que uma frequência de 10-12% em algumas regiões com 25% em específicos grupos. Em parte, esta diferença parece estar relacionada com a miscigenação da população (ORLANDO; NAOUM; SIQUEIRA; BONINI-DOMINGOS, 2000).

As talassemias do tipo alfa podem ser de origem hereditária e adquirida. Evidentemente as formas hereditárias são as mais comuns e atingem, pelo menos 4% da população brasileira. As formas adquiridas são secundárias a um processo patológico primário (BONINI-DOMINGOS *et al*, 2000).

A principal característica laboratorial da talassemia alfa é a visualização da Hb H em amostras de sangue hemolisados com saponina a 1% e submetidas à eletroforese em acetato de celulose. A Hb H pode apresentar concentrações visíveis a partir de 0,5% a 1,0%. Geralmente, portadores de Hb H com concentração entre 0,5% e 2,0% não mostram alterações numéricas no eritrograma. Por outro lado, portadores de Hb H com concentrações entre 3,0% e 7,0% apresentam eritrograma típico de talassemia menor, com eritrocitose em relação do hematócrito e índices VCM e HCM reduzidos. A doença de Hb H, entretanto, é de fácil diagnóstico, pois a concentração da Hb H é sempre maior que 15% e o eritrograma apresenta expressiva alteração morfológica associada a moderado grau de anemia (ZAMARO *et al*, 2002).

As dificuldades de diagnóstico se apresentam principalmente relacionadas a situações específicas, por exemplo: na interação alfa/beta talassemia, o desequilíbrio entre globinas alfa e beta pode ser mínimo e, dessa forma, a Hb H se torna indetectável por eletroforese ou na pesquisa citológica com azul de cresil brilhante (BONINI-DOMINGOS *et al*, 2007).

Portadores de traço falciforme (hemoglobina AS) associados à talassemia alfa apresentam alterações na morfologia dos eritrócitos, normalmente ausentes nos heterozigotos para esta variante de hemoglobina. A interação entre hemoglobina S e talassemia alfa tem sido descrita como um dos fatores responsáveis pela melhora no quadro clínico de portadores homozigotos de hemoglobina S, diminuindo os episódios de crises de falcização. A morfologia eritrocitária da maioria dos casos de interação Hb AS/alfa talassemia observados, apresentou-se alterada, com padrões de microcitose e hipocromia variando de discretos a moderados (STEIMBERG *et al*, 2001).

No Brasil, a prevalência de hemoglobinas anormais é influenciada por fatores ecológicos e raciais, conforme a região analisada. A estimativa de ocorrência média é de 4%, sem considerar a talassemia alfa, originada por um ou dois genes afetados (VIANA-BARACIOLI, 2001).

OBJETIVO GERAL

No presente estudo foi avaliado a prevalência das hemoglobinopatias S, C e talassemia beta em um grupo de pacientes no Laboratório Clínico (LAC) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC – Goiás).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as amostras pelo eritrograma;
- Analisar as amostras por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), identificar e quantificar as hemoglobinas variantes;
- Confirmar por meio da técnica de PCR a presença de hemoglobina S e C ;
- Investigar por meio da técnica de PCR-AE as mutações IVS I-6, IVS I-110, IVS I-1 e CD 39 nos pacientes com suspeitas de beta talassemia;
- Prevalência de hemoglobinas variantes comparados a grupos étnicos.

CASUÍSTICA E METODOLOGIA

1. Casuística

Foram coletadas 200 amostras de sangue periférico com EDTA, após consentimento informado, provenientes de pacientes do Laboratório Clínico da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, sem distinção de sexo, maiores de 18 anos, etnia ou classe social. O presente trabalho encontra-se em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, e com parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, sob protocolo número 76165.

A partir dos dados do eritrograma (VCM, HCM, CHCM e RDW) e HPLC realizados com as 200 amostras, foram selecionadas 44 amostras que apresentaram alguma alteração, conforme valores de referências (FAILACE, 2003) para investigação e análise por amplificação gênica alelo específica (PCR-AE), porém 2 amostras não apresentaram amplificação. A extração de DNA das amostras bem como a análise molecular para as mutações foram realizadas no Laboratório Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

Foram adotados como critérios de inclusão pacientes com exames encaminhados para o Laboratório Clínico da PUC-Goiás, maiores de 18 anos e ambos os sexos.

2. Metodologia

As amostras foram codificadas para se preservar a identidade dos indivíduos, e submetidas aos testes específicos para a determinação do perfil de hemoglobinas. A avaliação dos parâmetros hematológicos foi realizada por procedimentos automatizados, seguindo os padrões de controle de qualidade.

Os parâmetros hematológicos avaliados foram hematócrito, hemoglobina, contagem global de eritrócitos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e índice de anisocitose (RDW) conforme tabela 1, no equipamento automatizado Sysmex XE (Siemens®).

Tabela 1: Valores de referência dos níveis hematimétricos e HPLC

	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	HCM	CHCM	RDW
Homens	4,5 a 6,5 tera/L	13,5 a 18 g/dL	40 a 54%	82 a 101 fL	26 a 36 pg	31 a 36 g/dl	11 a 14,5%
Mulheres	4 a 5,6 tera/L	12 a 16,5 g/dL	35 a 47%	81 a 101 fL	27 a 36 pg	32 a 36 g/dl	11 a 14,5%

	Hb A1	Hb A2	Hb F
Adultos	94,3 a 96,5%	2,5 a 3,7%	0,5 a 2,0%

Fonte: Failace, 2003.

A morfologia eritrocitária foi observada no esfregaço sanguíneo por microscopia óptica comum após coloração pelo corante panótipo rápido (Newprov®). O tamanho, a coloração e as variações de formas eritrocitárias foram criteriosamente analisados conforme referências morfológicas de Failace (2003).

Em seguida as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em Sistema Variant II automatizado da Bio-Rad® com kit de análise para beta talassemia heterozigota (*Beta-Short-Thal*) (Bio-rad, 2014). Das 200 amostras analisadas 42 foram submetidas às análises moleculares que iniciaram com a extração e quantificação do DNA genômico.

2.1 Extração e quantificação do DNA genômico

A extração de DNA das 44 amostras de sangue periférico coletadas foram realizadas de acordo com as instruções do Kit comercial Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin® (GE 39 Healthcare, USA). Por conseguinte foram submetidas a quantificação no espectrofotômetro NanoVue™ Plus de acordo com as instruções do fabricante, tendo relevância apenas as amostras cujo resultado da quantificação em relação a concentração de DNA foi superior a 5ng/μl.

2.2 Amplificação do DNA genômico

A amplificação do material genético para a identificação dos genótipos de hemoglobina S, hemoglobina C, e talassemias beta com mutação do tipo códon 39, IVS I-110, IVS I-6 e IVS I-1, foi realizada pela técnica de amplificação gênica alelo específica (PCR-AE) segundo os protocolos de Bertholo & Moreira (2006).

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador Mini Cycler TM da MJ Research, conforme algoritmo estabelecido para o equipamento e na dependência do fragmento de DNA a amplificar e das T_m dos *primers* utilizados.

2.3 Identificação dos genótipos AA, AS, SS, AC, CC e SC Na determinação genotípica utilizamos 3 tubos para cada amostra de DNA para um volume final de 100 µL de reação, acrescentando 20 mmol/L de tampão, 0,2 mmol/L de cada dNTP; 1,5 mmol/L de MgCl₂; 1,25 U de Taq DNA polimerase (Gibco-BRL); 50,0 a 100,0 ng de DNA genômico e 0,2 mmol/L de cada *primer*, sendo no tubo 1 adicionados os *primers* Beta 5'-a, Beta 5'-b e Beta A-b; no tubo 2 os *primers* Beta 5'-a, Beta 5'-b e Beta C-b e no tubo 3 *primers* Beta 5'-a, Beta 5'-b e Beta S-b. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por 5 minutos, acrescida de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C 1 minuto, 65°C por 2 minutos seguida de uma extensão final a 65°C por 7 minutos. A análise dos produtos foi verificada em gel de agarose a 2% (Bertholo & Moreira, 2006 Adaptado – Temperatura de extensão final adaptada de 5 para 7 minutos).

2.4 Identificação dos genótipos IVS I-6 e IVS I-110

Para os genótipos IVS I-6 e IVS I-110 utilizou-se 2 tubos para cada amostra de DNA. Para IVS I-6 a reação de PCR-AE foi realizada para um volume final de 100 µL de reação: 10 mmol/L de tampão, 0,2 mmol/L de cada dNTP; 1,5 mmol/L de MgCl₂; 1,25 U de Taq DNA polimerase; 50,0 a 100,0 ng de DNA genômico e 0,2 mmol/L de cada *primer*, sendo no tubo 1 adicionados os *primers* PCO1, PCO9 e IVSI6W e no tubo 2 os *primers* PCO1, PCO9 e IVSI6M. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por 7 minutos, acrescida de 32 ciclos de 94°C por 50 segundos, 54°C por 50 segundos, 72°C por 50 segundos e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A reação de PCR-AE para IVS I-110 foi realizada nas mesmas condições acima utilizando os *primers* PCO1, PCO9 e TB110W no tubo 1 e PCO1, PCO9 e TB110M no segundo tubo; no processo de amplificação a temperatura de hibridização foi de 55°C, realizando-se 30 ciclos. A análise dos produtos foi verificada em gel de agarose a 2% (Bertholo & Moreira, 2006).

2.5 Identificação dos genótipos IVS I-1 e CD 39

Para os genótipos IVS I-1 e CD 39 utilizou-se 2 tubos para cada amostra de DNA. Para CD39, a reação de PCR-AE foi realizada para um volume final de 100 µL de reação: 10 mmol/L de tampão, 0,2 mmol/L de cada dNTP; 1,5 mmol/L de

MgCl₂; 1,25 U de Go Taq DNA polimerase (Promega); 50,0 a 100,0 ng de DNA genômico e 0,2 mmol/L de cada *primer*, sendo no tubo 1 adicionados os *primers* PCO1, PCO9 e PS39W e no tubo 2 os *primers* PCO1, PCO9 e PS39M. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por 7 minutos, acrescida de 32 ciclos de 94°C por 50 segundos, 54°C por 50 segundos, 72°C por 50 segundos e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A reação de PCR-AE para IVS I-1 foi realizada nas mesmas condições acima com pequenas alterações: utilização de *primers* PCO1, PCO9 e IVSI1W no tubo 1 e PCO1, PCO9 e IVSI1M no segundo tubo; no processo de amplificação a temperatura de hibridização também foi de 54°C, realizando-se 35 ciclos. A análise dos produtos foi verificada em gel de agarose a 2% (Bertholo & Moreira, 2006).

2.6 Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados nas reações em cadeia da polimerase

As sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados nas reações em cadeia da polimerase alelo específicas para a identificação de alterações nos genes das globinas beta humana estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 - Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados nas reações em cadeia da polimerase

PRIMERS	SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	COORDENADAS GENBANK LOCUS HUMHBB
Beta 5'-a Sense	5' GTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCA 3'	62008 – 62033
Beta 5'-b Antisense	5' AGGGGAAAAGAAAACATCAA 3'	62649 – 62667
Beta A-bAntisense	5' TAACGGCAGACTTCTCCTC 3'	62205- 62223
Beta C-b Antisense	5' TAACGGCAGACTTCTCCTT 3'	62205- 62223
Beta S-bAntisense	5' TAACGGCAGACTTCTCCAC 3'	62205 – 62223
PCO1 Sense	5' GTCCAACCTCCTAAGCCAGTG 3'	61969 – 61988
PCO9 Antisense	5' CAGATACCCTGGGAACACTACA 3'	62636 – 62655
TB110W Antisense	5' GGGTGGGAAAATAGACC 3'	62379- 62395
TB110M Antisense	5'GGGTGGGAAAATAGACT 3'	62379- 62395
PS39W Antisense	5' GACTCAAAGAACCTCTG 3'	62424- 62441
PS39M Antisense	5' GACTCAAAGAACCTCTA 3'	62424- 62441
IVSI6W Antisense	5' GTCTTGTAACCTTGATA 3'	62282-62298
IVSI6M Antisense	5' GTCTTGTAACCTTGATG 3'	62282-62298
IVSI1WAntisense	5' GTAACCTTGATACCAAC 3'	62277-62293

IVSI1M Antisense	5' GTAACCTTGATACCAA 3'	62277-62293
------------------	------------------------	-------------

Fonte: Bertholo e Moreira, 2006.

2.7 Análise dos dados

Os resultados foram tabulados e analisados no programa estatístico do pacote Office® Excel, pelos testes estatísticos de média, mínima e máxima.

RESULTADOS

Das 200 amostras analisadas 16,5% (33/200) apresentaram alguma alteração no eritrograma em ambos os sexos, sendo hemácias, hemoglobina, hematócrito e VCM (Gráfico 1) quando comparados com os valores de referência (Tabela 1) para o respectivo sexo.

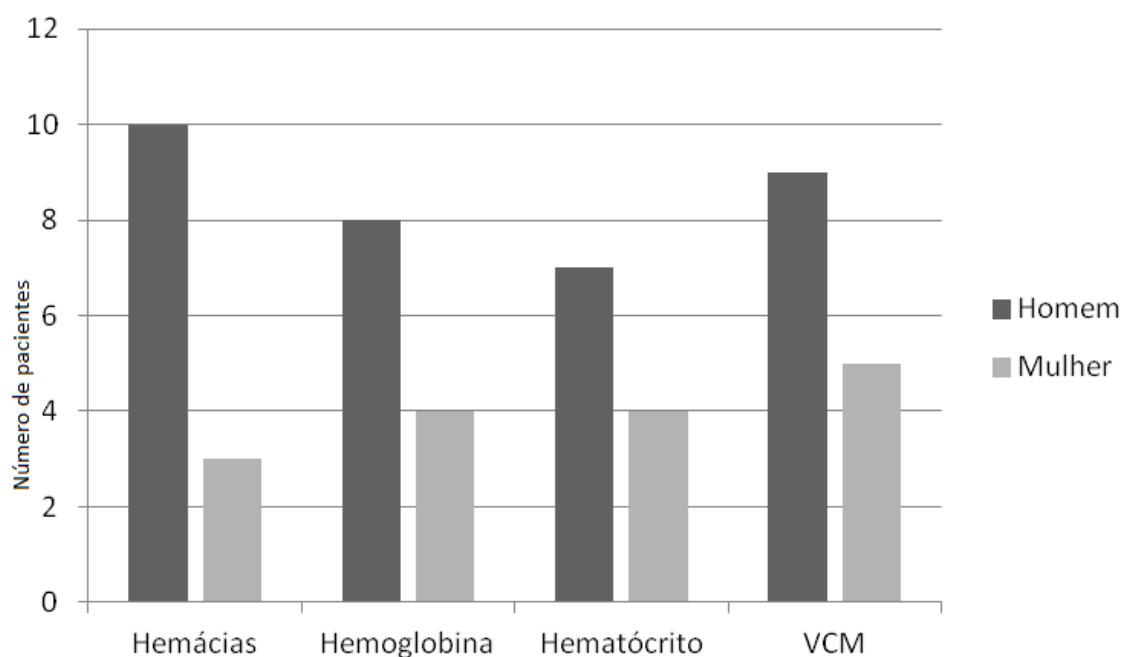


Gráfico 1: Alterações no eritrograma. Número de pacientes por gênero com alteração nos parâmetros hemácias, hemoglobina, hematócrito e VCM.

Quando foi analisado o parâmetro hemácias foram encontrados 5%(10/200) pacientes fora do valor de referência. Para parâmetro hemoglobina foram encontrados 4% (8/200) pacientes fora do valor de referência. Quando foi analisado o parâmetro hematócrito foram encontrados 3,5% (7/200) pacientes fora do valor de referência. Para parâmetro volume corpuscular médio foram encontrados 4,5%(9/200) pacientes fora do valor de referência (Tabela 3).

Tabela3: Percentual de pacientes que apresentaram resultados alterados em relação aos valores de referência específicos. Failace, 2003.

Parâmetro	Fora do valor de referência	Adequado ao valor de referência
Hemácias	5%(10)	95% (190)
Hemoglobina	4%(8)	96% (192)

Hematócrito	3,5% (7)	96,5% (193)
VCM	4,5% (9)	95,5% (191)
Total	34	

Por meio da HPLC foram identificadas uma amostra com perfil hemoglobínico AS (Figura 5), apresentando 64,5% de Hb S, 19,6% de Hb F e 7,0% de A2. 02 amostras com perfil hemoglobínico AC, 22 amostras com aumento de Hb A2 e 10 com aumento de Hb Fetal, sugestivas de beta talassemia, representadas no Gráfico 2. Podendo apresentar mais de uma alteração por paciente.

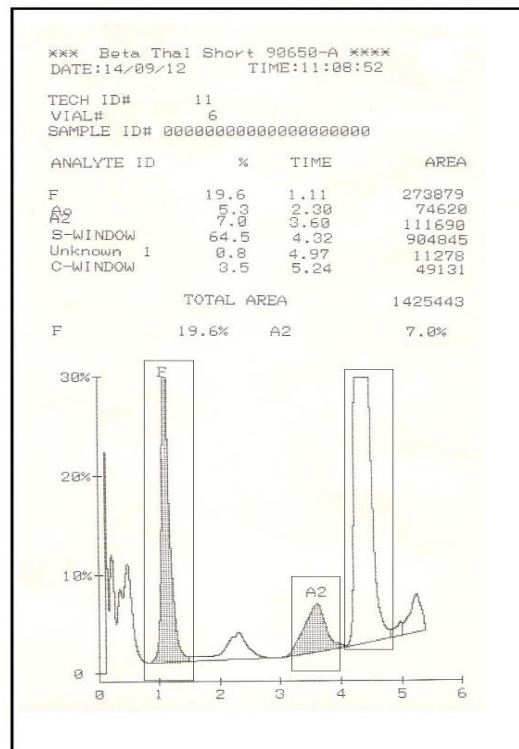


Figura 5 - Perfil cromatográfico observado por HPLC com equipamento Variant Bio-rad, e kit de diagnóstico para betatalassemia, evidenciando 64,5% de Hb S, 19,6% de Hb F e 7,0% de Hb A2.

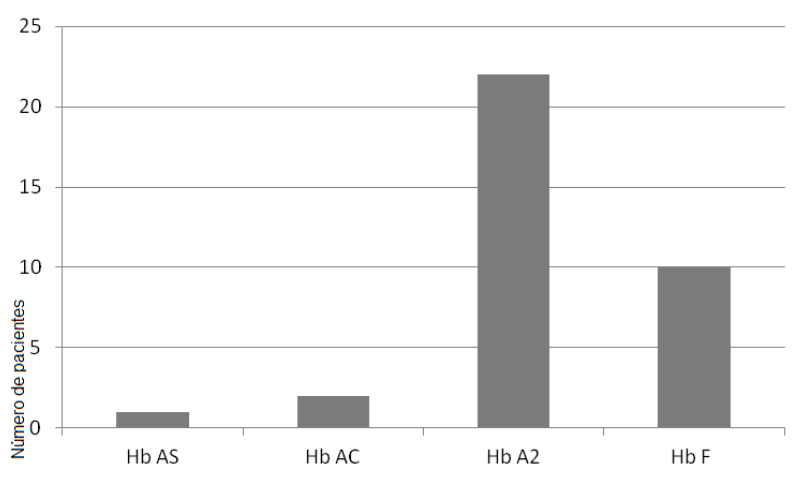


Gráfico 2: Número de pacientes que apresentaram hemoglobina S, C ou aumento da concentração de Hb A2 e Hb fetal. **Fonte:** Rabelo, 2014.

O total de 42 amostras foram submetidas à análise molecular para determinação dos genótipos AS, SS e AC e análise das mutações IVS I-1, IVS I-6, IVS I-110 e CD 39.

Para a identificação dos genótipos AA, AS, SS, AC, CC e SC foi observado como produto de amplificação, uma banda de 660 pb que caracterizava a validade e efetividade da reação, representando o controle positivo da mesma e devendo estar presente nos 3 tubos, enquanto uma banda de 216 pb apareceu na dependência do *primer* utilizado, S (Figura 6) e C (Figura 7), permitindo caracterizar os diferentes genótipos.

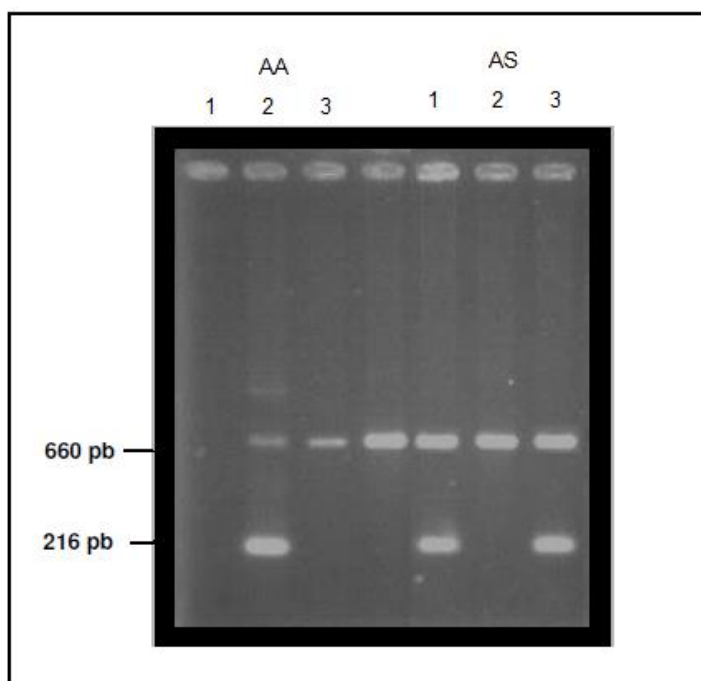


Figura 6: PCR alelo específica para identificação dos genótipos AA e AS. Produtos de amplificação observados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X pH 8,5, evidenciando bandas de 660 e 216 pb na dependência do genótipo analisado. **Fonte:** Rabelo, 2014.

Para determinar os genótipos da talassemia do tipo beta, observou-se como produto de amplificação, uma banda de 687 pb, como o controle positivo da reação, enquanto uma banda de 331pb para o genótipo IVS I-6 (Figura 8) e 326 pb para IVS I-1. As mutações IVS I-110 e CD 39 não foram visualizadas no grupo amostral.

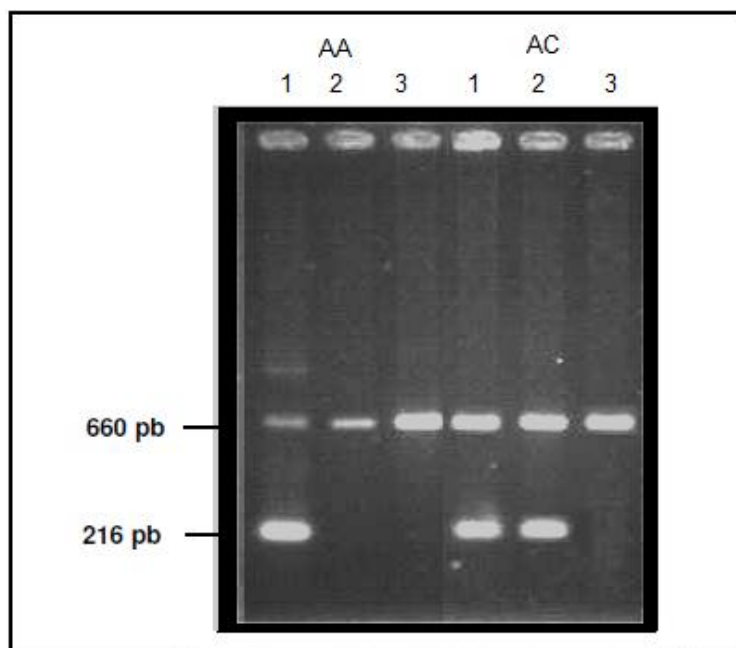


Figura 7: PCR alelo específica para identificação dos genótipos AA e AC. Produtos de amplificação observados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X pH 8,5, evidenciando bandas de 660 e 216 pb na dependência do genótipo analisado. **Fonte:** Rabelo, 2014.

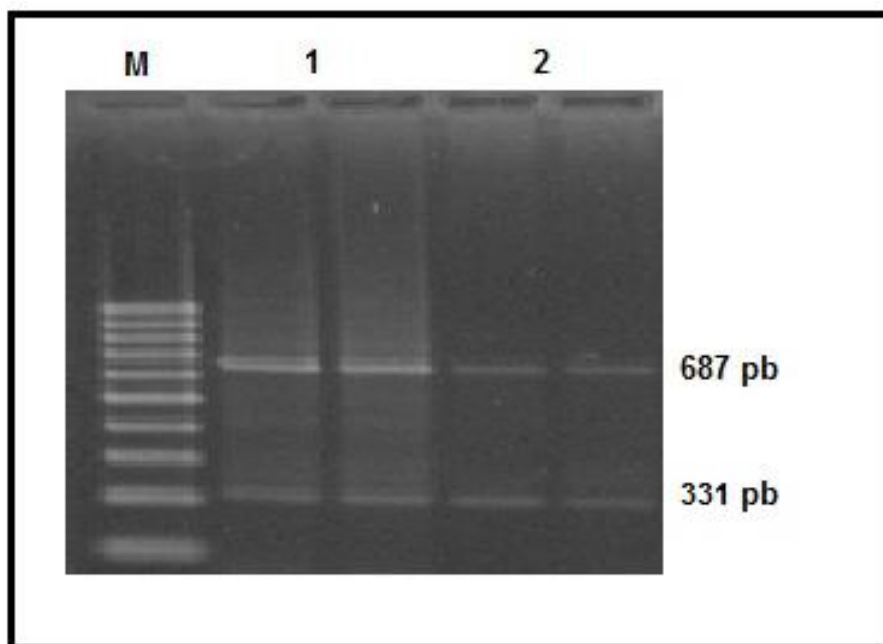


Figura 8: PCR alelo específica para identificação dos genótipos IVS I-6. Produtos de amplificação observados por eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TBE 1X pH 8,5, evidenciando bandas de 687 e 331 pb na dependência do genótipo analisado. **Fonte:** Rabelo, 2014.

Em todas as reações em cadeia da polimerase alelo específica realizadas para a identificação das hemoglobinopatias deste estudo, o controle interno foi amplificado com sucesso.

Foram realizadas 42 PCR-AE, onde foi detectado a amplificação de 1 genótipo AS, 2 genótipos AC, 1 IVS I-1 e 2 IVS I-6.

Foram observados três grupos étnicos no estudo, sendo 33,5% (67/200) auto classificados como pardos, 18,5% (37/200) como negros e 48%(96/200) como brancos (Gráfico 3).

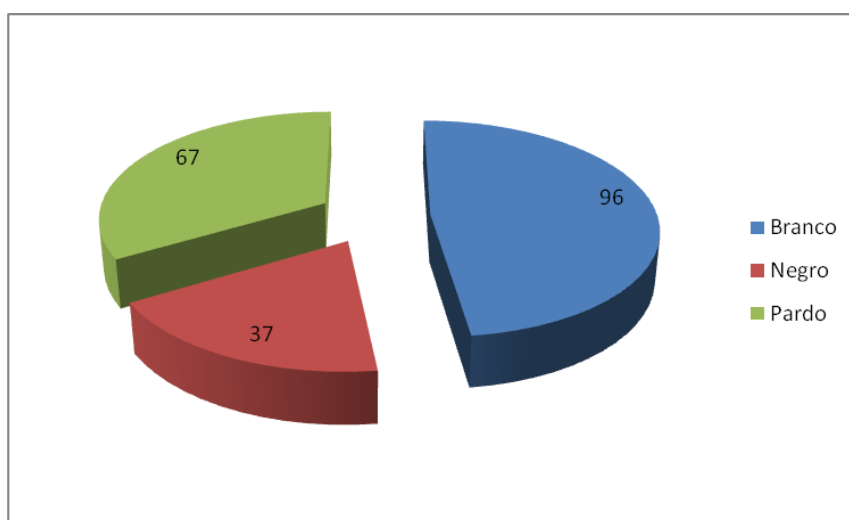


Gráfico 3: Percentual de indivíduos nos grupos étnicos.

Considerando a variação de idade dos pacientes, foi observado pacientes com no mínimo 18 anos e no máximo 89 anos e idade média de 45,9 anos.

Tabela 4: Faixa etária dos pacientes

Faixa etária	Nº de pacientes	
	N	%
18 - 27 anos	35	(18%)
28 - 37 anos	51	(26%)
38 - 47 anos	31	(16%)
48 - 57 anos	28	(14%)
58 - 67 anos	30	(15%)
68 - 77 anos	13	(6%)
78 - 89 anos	12	(5%)
total	200	(100%)

A prevalência de indivíduos com perfil heterozigoto para Hb S na população estudada foi de 0,5%(1/200), para o perfil heterozigoto da Hb C foram observados 1% (2/200) . A prevalência de indivíduos com beta talassemia foi de 0,5%(1/200) para a mutação IVS I-1 e 1%(2/200) para a mutação IVS I-6. A mutação para Hb AS foi observada em paciente de etnia negra, já a mutação para Hb AC foi observada em pacientes de etnia parda. Já para beta talassemia foi observado 67%(2/3) com etnia branca e 33%(1/3) com etnia parda.

DISCUSSÃO

O conjunto de resultados laboratoriais, tanto das metodologias clássicas, quanto das moleculares, contribuem para o conhecimento das hemoglobinas no Brasil, elucidando interações e auxiliando na orientação genético-educacional (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 2007). Segundo o estudo de Chinelato-Fernandes (2005) no período de julho de 2000 a fevereiro de 2003 foram analisadas 220 amostras de sangue periférico de indivíduos com suspeita de serem portadores de hemoglobinas variantes, provenientes de oito estados do Brasil. Desse total, 98 amostras apresentaram uma fração hemoglobínica com padrão de migração semelhante à Hb S em eletroforese alcalina em acetato de celulose. No presente estudo, não foi observado Hb com padrão de migração semelhante à Hb S, visto que não utilizamos a metodologia de eletroforese em acetato de celulose.

Estudos populacionais permitem o diagnóstico de heterozigotos e o aconselhamento genético fornecendo subsídios para que os indivíduos decidam conscientemente sobre sua prole, além da melhoria na qualidade de vida dos doentes (ORLANDO, 2000). Neste contexto é possível realizar estudos preventivos de hemoglobinopatias, principalmente nas regiões em que a incidência dessas alterações alcança freqüências marcantes para a saúde pública, enfocando da melhor maneira a população e o tipo de hemoglobinopatia que a acomete. A elaboração de programas preventivos requer o suporte de órgãos oficiais de saúde, treinamento de pessoal capacitado para diagnóstico, aconselhamento genético e clínico dos pacientes e casais de risco (*World Health Organization*, 1989; ORLANDO, 2000).

Kessler (1989), revisando a literatura posterior a 1979 a respeito dos aspectos educacionais e reprodutivos dos programas de aconselhamento genético, verificou que, a despeito das diferenças metodológicas, esses programas geralmente alcançam os seus objetivos no que se refere aos aspectos educacionais, à informação sobre o diagnóstico e o risco genético. Já no que se refere às decisões reprodutivas após o aconselhamento genético, eles não revelam uma eficiência semelhante.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 270 milhões de pessoas de todos os continentes carregam genes que determinam a presença de hemoglobinas anormais (ASSIS, 2010).

Como medida de prevenção e controle dessas doenças, o Ministério da Saúde incluiu, em 2001, o teste para hemoglobinopatias no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN). Desde então, a partir do diagnóstico das crianças, os exames para

identificação dessa patologia passaram a ser realizados nos pais, que constataram tais anormalidades genéticas.

A Organização Mundial de Saúde recomenda a implantação de programas para prevenção e controle de hemoglobinopatias na América Latina, especialmente no Brasil (THOMAS; LOTHAR, 2002). A organização de um programa preventivo requer suporte dos órgãos oficiais de saúde, treinamento de pessoal capacitado para diagnóstico, aconselhamento genético e clínico dos pacientes (ORLANDO, 2000). O sucesso destes programas depende da receptividade, disponibilidade e interesse da população a ser estudada (ZAMARO *et al*, 2002).

A detecção de indivíduos portadores das formas imperceptíveis de hemoglobinopatias, os heterozigotos, são extremamente importantes para a saúde pública pois, além de representarem fonte de novos heterozigotos, podem, através de casamentos entre portadores, originar indivíduos homozigotos e duplos heterozigotos como, por exemplo, os portadores de hemoglobina SC (Hb SC), que manifestam uma forma clínica (ORLANDO, 2000). Dessa forma, destacamos que os pontos fundamentais de um programa preventivo de hemoglobinopatias compreende a divulgação da informação à população, o reconhecimento de heterozigotos, diagnóstico neonatal, e aconselhamento genético. Este compreende atividades de esclarecimento ao portador da alteração de maneira clara devendo ser realizado por especialista ou geneticista com material informativo específico (ZAMARO *et al*, 2002).

As hemoglobinas S e D apresentam padrão semelhante no gel de eletroforese, deixando o diagnóstico impreciso. Porém o tratamento para ambas é o mesmo, não apresentando diferença na conduta do clínico (ZAMARO, 2002).

É possível inferir que o diagnóstico molecular de hemoglobinas variantes e talassemias deveria ser incluído na rotina laboratorial como exame complementar e necessário na identificação dessas desordens genéticas no Brasil, visto que a população brasileira apresenta genes para as hemoglobinas anormais com frequências variáveis e influenciadas por seus grupos raciais formadores. Portanto, a detecção dos portadores destas alterações genéticas é de importância para a saúde pública, pois representam fonte de novos heterozigotos e de possíveis homozigotos. O controle das hemoglobinopatias tem sido possível por meio do aconselhamento genético e diagnóstico precoce. O acompanhamento clínico dos homozigotos, o esclarecimento dos heterozigotos e em especial dos casais de risco, pode contribuir para evitar o nascimento de crianças portadoras de uma patologia genética, muitas vezes letal (VIANA-BARACIOLI, 2001).

A PCR é também uma técnica versátil, pois a partir de modificações nas condições da reação (*primers*, temperaturas, tampões), podem-se amplificar diversas sequências de DNA e conseqüentemente, identificarem os diferentes genes, portadores ou não da mutação. Estes atributos levaram ao desenvolvimento de uma ampla variedade de métodos baseados na PCR, tanto para pesquisa quanto para diagnóstico clínico de rotina (ZAMARO; 2003). A investigação dos genótipos A, S, C e beta talassemia foram possíveis nesse trabalho a partir da utilização de *primers* específicos e demais constituintes da PCR, sob condições de ciclagem e temperatura específicas.

Na identificação por metodologia molecular vários autores relatam o uso de oligonucleotídeos alelo-específicos e PCR seguida de restrição enzimática para a verificação de alterações na molécula de hemoglobinas S e C, e interações (BERTHOLO, 2006). Neste trabalho utilizamos a reação em cadeia da polimerase alelo-específica (PCR-AE), permitindo a detecção direta do alelo normal ou mutante no DNA genômico, sem provas adicionais de hibridização, ligação ou clivagem com enzima de restrição ou o uso de radioatividade, garantindo ainda um custo operacional mais baixo. Através da PCR-AE foi possível distinguir os alelos mutantes S e C heterozigotos além de diferenciá-los do alelo normal.

Tem sido estimado que aproximadamente 7% de toda população no mundo são portadoras de beta talassemia e, que 300.000 a 500.000 crianças nascem, por ano, com a forma grave desta doença (PREMAWARDHENA *et al.*, 2001). No Brasil, a beta talassemia tem sido estudada, no entanto, devido às limitações tais como, dificuldade de padronização das metodologias laboratoriais de diagnóstico; ao grande número amostral, diversidade étnica e ao alto grau de miscigenação racial do país, os dados sobre a real prevalência da beta talassemia ainda são escassos e fragmentados.

Os imigrantes que auxiliaram na formação do povo brasileiro, foram responsáveis pelo aparecimento de quatro dessas mutações representadas pelo códon 39, IVS I-1, IVS I-6 e IVS I-110, sendo as duas primeiras do tipo β^0 e as duas últimas do tipo β^+ (MARTINS, 2010)

No estudo de Freitas e colaboradores (2010) as mutações IVS I-6, CD-39 e IVS I-1 para beta talassemia foram caracterizadas em 68,2% dos casos de beta talassemia. A mutação mais frequente foi a IVS I-6 que esteve presente em 14 dos 44 alelos estudados, ou seja, 45,5%, seguida da CD 39 (18,2%) e IVS I-1 (4,5%). Pesquisadores têm demonstrado, no Brasil, diferentes perfis de mutações para beta talassemia com maior frequência da IVS I-110, CD 39 no sul do país (REICHERT,

2006), de IVS I-6 no nordeste (ARAÚJO ET AL., 2006), IVS I-110 e a CD 39 na região sudeste do país (FONSECA ET AL., 1998).

Reichert e colaboradores (2008) demonstram uma diferença significativa das variáveis VCM, HCM, CHCM e Hb A2 entre os pacientes com a mutação IVS I-6 em relação às outras mutações (IVS I-1, IVS I-110 e códon 39).

Bertuzzo, Sonati e Costa (1997), demonstram que níveis elevados de HCM e Hb A2 podem estar associados com a presença de mutações brandas de talassemia como no caso de heterozigotos para IVS I-6 quando comparados aos heterozigotos para as mutações CD 39 e IVS I-1.

Os programas de prevenção colaboram para a conscientização dos heterozigotos fornecendo informações para que possam decidir responsavelmente sobre o futuro de seus descendentes; favorece o direcionamento clínico nos casos mais brandos e indica o acompanhamento adequado aos portadores das formas graves da doença. É importante uma tecnologia adequada para o diagnóstico, utilizando vários testes laboratoriais seletivos e de confirmação, dados clínicos e estudo familiar, bem como a formação de pessoal capacitado para o diagnóstico laboratorial correto (ORLANDO, NAOUM, SIQUEIRA, BONINI-DOMINGOS, 2000).

CONCLUSÃO

Os resultados globais deste estudo evidenciaram a necessidade de melhor caracterização dos perfis de hemoglobina obtidos pelos métodos clássicos, e a importância da caracterização molecular destes defeitos que refletem a diversidade genética da população brasileira.

Valores hematimétricos alterados foram observados em 33(16,5%) da população estudada. E 22 (11%) pacientes apresentaram Hb A2 e/ou Hb F aumentados por HPLC.

Foi observado por PCR-AE a prevalência das hemoglobinopatias S e C na população estudada, sendo 1 (0,5%) dos pacientes heterozigoto para S e 2(1%) heterozigotos para C. Para beta-talassemia as mutações IVS I-6 foram observadas em 2(1%) dos pacientes e para a mutação IVS I-1 foram observados em 1(0,5%) dos pacientes. Os pacientes com mutação IVS I-6, um apresentou somente aumento de Hb A2, e o outro apresentou aumento de Hb A2 e Hb F. Já para IVS I-1 foi observado apenas o aumento de Hb A2. Os pacientes com beta talassemia não apresentavam associação de outra hemoglobina variante dentre as testadas (S e C).

Através da análise de hemoglobinas no grupo populacional estudado, observamos que a escolha da metodologia laboratorial oferece subsídios para a correta avaliação das diferentes formas de hemoglobinas anormais, cujo diagnóstico laboratorial assertivo dependerá da combinação dos métodos aplicados na triagem e confirmação dos suspeitos.

O presente estudo demonstrou que não foi constatada diferença significativa na prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes em relação aos grupos étnicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, LP et al. O laboratório clínico na investigação dos distúrbios da hemoglobina. *Jornal Bras Med Lab*, v. 47, n. 3, p. 271-278, 2011.

ARAÚJO, KI; CAPPELLINI, MD; RACHMILEWITZ, EA. Beta-thalassaemia and sickle cell anaemia as paradigms of hypercoagulability. *Br. J. Haematol.*, v. 139, p. 3-13, 2007.

ASSIS AS, OLIVEIRA, CSC, REIS FP. Estudo das Síndromes falcêmicas em comunidade Quimbola, Sergipe / Brasil. Dissertação de Mestrado do Programa Saúde e Ambiente de UNIT, Sergipe, 2010.

BERTHOLO LC, MOREIRA HW. Amplificação gênica alelo específica e multiplex no diagnóstico laboratorial de hemoglobinas anormais. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, 2005.

BERTHOLO LC, MOREIRA HW. Amplificação gênica alelo-específica na caracterização das hemoglobinas S, C e D e as interações entre elas e talassemias beta. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* v. 42, n. 4, 2006.

BERTUZZO, CS; SONATI, MF; COSTA, FF. Hematological phenotype and the type of beta thalassaemia mutation in Brazil. *Braz. J. Gen.*, v. 20, n. 2, p. 319-321, 1997.

BIO-RAD LABORATORIES. Disponível em: www.bio-rad.com/diagnostics [Acesso em: 29/09/2014]

BONINI-DOMINGOS CR et al. Hemoglobinas AS/Alfa talassemia - importância diagnóstica. *Rev.bras.hematol.hemoter*; v. 22, n. 3, p. 388-394, 2000.

BONINI-DOMINGOS CR, VIANA-BARACIOLI LMS; Identificação de variantes de hemoglobina em doadores de sangue. São José do Rio Preto. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter* v. 26, n.1, 2004.

BONINI-DOMINGOS CR. Thalassemiascreening in Brazil – Results for 20 years. São José do Rio Preto. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* v. 26, n.1, 2006.

CARVALHO LB. Avaliação da expressão da talassemia do tipo beta no Brasil pela co-herança com defeitos de hemocromatose. Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociência da Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2003.

CHINELATO-FERNANDES ANA R., BONINI-DOMINGOS CLAUDIA R.. Contribuição do estudo molecular de hemoglobinas S-like para o conhecimento da diversidade genética da população brasileira. Rev. Bras. Hematol. Hemoter.; v. 27, n. 3, p. 208-210, 2005.

CHINELATO-FERNANDES AR, BONINI-DOMINGOS CR. Contribuição do estudo molecular de hemoglobinas S-like para o conhecimento da diversidade genética da população brasileira. São José do Rio Preto. Rev. Bras. Hematol. Hemoter, v. 38, n.3, 2005.

CHINELATO-FERNANDES AR, BONINI-DOMINGOS CR. Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinas variantes. São José do Rio Preto. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. v. 28, n.1, 2006.

COMPRI MARIANE B., POLIMENO NEWTON C., STELLA MÉRCIA B., RAMALHO ANTÔNIO S. Programa comunitário de hemoglobinopatias hereditárias em população estudantil brasileira. Rev. Saúde Pública.; v. 30, n. 2,p. 187-195, 1996.

A DATABASE OF HUMAN HEMOGLOBIN VARIANTES AND THALASSEMIAS [Internet]. Editado em: 05/09/2014. Disponível em: HbVar, [HTTP://globin.cse.psu.edu/globin/hbvar/](http://globin.cse.psu.edu/globin/hbvar/)

DUCATTI R P et al. Investigação de hemoglobinopatias em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos do hospital de Base de São José do Rio Preto. Rev Bras. Hematolo.hemoter v. 23, n. 1, p. 23-29, 2011.

FAILACE, R. MANUAL DE HEMATOLOGIA. Ed. ArtMed, 4ª Ed., 2003.

FERREIRA, MCB. Doença falciforme: Um olhar sobre a assistência prestada na rede pública estadual – Hemocentro Regional. Dissertação de Mestrado Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, 2012.

FLINT, J; HARDING, RM; BOYCE, AJ; CLEGG, JB. The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillière's Clin. Haematol.*; v. 11, n. 1, p. 197-207, 1998.

FONSECA SF, et al. Genetic analysis of beta-thalassemia major and beta-thalassemia intermediate in Brazil. *Hemoglobin*; v. 22, p. 197-207, 1998.

FREITAS, MF; GONCALVES, RP. Caracterização clínica, hematológica e molecular dos adultos com beta talassemia no Ceará. Dissertação (Mestrado). Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará, Departamento de Pós-Graduação em Patologia, 2010.

GULBIS B, VERTONGEN VMF. Interference of Hemoglobin D in Hemoglobin A₂ Measurement by Cation-Exchange HPLC. *Clinical Chemistry*; v. 45, n. 8, p. 1317-1318, 1999.

HARJU S, MCQUEEN KJ, PETERSON KR. Chromatin Structure and Control of β -Like Globin Gene Switching. *ExpBiol Med*; v. 227, n. 9, p. 683-700, 2002.

KESSLER, S. Psychological aspects of genetic counseling: a critical review of literature dealing with education and reproduction. *Am.J.Med.Genet.*, v. 34, p. 340-53, 1989.

LEONELI GG et al. Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnóstica. São José do Rio Preto. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*; v. 22, n. 3, p. 396-403, 2000.

LLANO JC, GONZÁLEZ MC, HIDALGO CALCINES PC. Separación de hemoglobina A₂ y hemoglobina C por cromatografía em carboximetilcelulosa (CM-52) com amortiguado rimidazol-HCl-KCN-NaCl Lic Ciudad de la Habana. *Rev Cubana Invest Bioméd*; v. 17, n. 3, 1998.

MOLETE JM et al. Sequences flanking hypersensitive sites of the beta-globin locus control region are required for synergistic enhancement. Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania 16802, USA. *Mol Cell Biol.*; v. 21, n.9, p. 2969-80, 2001.

NAOUM PC, BONINI-DOMINGOS CR. Dificuldades no diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* V. 29, n. 3, p. 226-228, 2007 .

NAOUM PC, MORAES MC, RADISPIEL J, CAVALHERI PP, VALERI FF. Hb D/Talassemia beta associada à anemia. São José do Rio Preto. Rev. Bras. Hematol. Hemoter.; v. 24, n.1, 2002.

NAOUM PC, RADISPIEL J, MORAES MS. Dosagem espectrométrica de metaemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. São José do Rio Preto. Rev. Bras. Hematol. Hemoter.; v. 26, n. 1, 2004.

NAOUM PC, SOUZA PC. Avaliação dos produtos da degradação oxidativa da Hb S nos genótipos SS, SF (S/β0 talassemia) e AS, em comparação com hemoglobinas normais. J Bras Patol Med Lab; v. 40, n. 4, p. 249-59, 2004.

NAOUM PC. Dificuldades no diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias. Rev. bras. hematol. hemoter.; v. 29, n. 3, p. 226-228, 2007.

NAOUM PC. Hemoglobinopatias e talassemias. São Paulo. Ed. Sarvier; p. 171, 1997.

OLATUNJI PO, FALUSI AG, SHOKUNBI WA, ESSIEN EM. Haemoglobin A2 (Hb A2) and malaria. Cent Afr J Med.; v. 39, n. 5, p. 102-4, 1993.

ONDEI LS, ZAMARO PJA, BONINI-DOMINGOS CR. A importância do diagnóstico laboratorial clássico na identificação de variantes de hemoglobinas. São José do Rio Preto. Rev. Bras. Hematol. Hemoter; v. 27, n. 1, 2005.

ORLANDO GISELDA M., NAOUM PAULO C., SIQUEIRA FATIMA A. M., BONINI-DOMINGOS CLÁUDIA R.. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. Rev. Bras. Hematol. Hemoter.; v. 22, n. 2, p. 111-121, 2000.

ORLANDO GM, NAOUM PC, SIQUEIRA FAM, BONINI-DOMINGOS CR. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. São José do Rio Preto. Rev. Bras. Hematol. Hemoter.; v. 22, n.2, 2000.

PAIVA E SILVA RB, RAMALHO AS. Riscos e benefícios da triagem genética: o traço falciforme como modelo de estudo em uma população brasileira. Rio de Janeiro. Cad. Saúde Pública; v. 13, n. 2, 1997.

PERUTZ MF. Frequency of abnormal human haemoglobins caused by C-T transitions in CpG dinucleotides. Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, U.K. *Boll Soc Ital Biol Sper.*; v. 66, n. 9, p. 809-19, 1990.

PREMAWARDHENA, A; FISHER, CA; FATHIU, F; DE SILVA, S; PEREIRA, W.; PETO, TEA; OLIVIERI, NF; WEATHERALL, D. Genetic determinants of Jaundice and Gallstones in Haemoglobin E Beta Thalassemia. *Lancet.*, v. 357, p. 1945-1946, 2001.

RAMALHO, A.S. As hemoglobinopatias hereditárias: um problema de saúde pública no Brasil. São Paulo: FCA, 1986.

REICHERT, VCD.; de CASTRO, SM; WAGNER, SC; de ALBUQUERQUE, DM.; HUTZ, MH.; LEISTNER-SEGAL, S. Identification of beta thalassemia mutations in South Brazilians. *Ann. Hematol.*; v. 87, n. 5, p. 381-384, 2008.

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

ROCHA LBS et al. Distribuição das mutações da β -talassemia em Fortaleza, Ceará. *J Bras Patol Med Lab*; v. 46, n. 6, p. 437-441, 2010.

SOUZA et al. Avaliação de Hb A2 e Hb F em doadores de sangue da região malarígena da Amazônia Oriental brasileira por HPLC. *Rev.bras.hematol.hemoter.*; v. 25, n. 4, p.263-266, 2003.

STEIMBERG MH. et al. Pathophysiological-Based Approaches to Treatment of Sickle Cell Disease. *Annu. Rev. Med.*; v. 54, p. 89-112, 2003.

TALMACI R, TRAEGER-SYNODINOS J, KANAVAKIS E, CORIU D, COLITA D, GAVRILA L. J. Scanning of β -globin gene for identification of beta-thalassemia mutation in Romanian population. *Cell. Mol. Med.*; v. 8, n. 2, 2004.

THEIN SL. Genetic insights into the clinical diversity of β thalassaemia. *British Journal of Haematology*; v. 124, n. 3, p. 264–274, 2004.

THOMAS C, LOTHAR T. Biochemical Markers and Hematologic Indices in the Diagnosis of Functional Iron Deficiency. *Clinical Chemistry*; v. 48, n. 7, p. 1066-1076, 2002.

VIANA-BARACIOLI LMS. et al. Prevenção de hemoglobinopatias a partir do estudo em gestantes. *Rev.bras.hematol.hemoter*; v. 23, n. 1, p. 31-39, 2001.

W.H.O. World Health Organization. In: Annual Meeting of the WHO, Cagliari. Report: working group on the feasibility study on hereditary disease community control programmes (hereditary anaemias), 1989.

WALKER MR, RAPLEY R. Guia de rotas na tecnologia do gene. São Paulo. Atheneu Editora; 334, 1999.

ZAMARO PJA et al Análise quantitativa e molecular de hemoglobina fetal em indivíduos da população brasileira, *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*; v. 25, n. 4, p. 223-229, 2003.

ZAMARO PJA et al. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinas semelhantes à HbS. Rio de Janeiro. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*; v. 38, n. 4, 2002.

ZAMARO PJA, HIDALGO CA, BONINI-DOMINGOS CR. Análise quantitativa e molecular de hemoglobina fetal em indivíduos da população brasileira. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*; v. 25, n. 4, p. 223-229, 2003.

ZAMARO PJA. Análise quantitativa e molecular de hemoglobina fetal em doadores de sangue. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*; v.4, n. 4, p. 312-313, 2002.