

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: CLÍNICA MÉDICA**

**Identificação de Mutações para Beta Talassemia em uma População do Extremo Sul  
do Brasil.**

Pós-Graduanda: Vivian Caroline Dadalt Reichert

Orientadora: Dra. Sandra Leistner Segal

Dissertação de Mestrado

2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: CLÍNICA MÉDICA**

**Identificação de Mutações para Beta Talassemia em uma População do Extremo Sul  
do Brasil.**

Pós-Graduanda: Vivian Caroline Dadalt Reichert

Orientadora: Dra. Sandra Leistner Segal

Dissertação de Mestrado

2006

**R351i** Reichert, Vivian Caroline Dadalt

Identificação de mutações para beta talassemia em uma população do extremo sul do Brasil / Vivian Caroline Dadalt Reichert ; orient. Sandra Leistner Segal. – 2006. 101 f. ; il. color.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2006.

1. Talassemia beta 2. Mutações 3. Rio Grande do Sul I. Segal, Sandra Leistner II. Título.

NLM: WH 170

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

## **AGRADECIMENTOS**

À Sandra, por me ajudar a manter a calma nos momentos mais difíceis e pelo crescimento que me proporcionou.

À Simone, pelo exemplo de perseverança e por me apoiar incondicionalmente.

À Sandrine, por sempre me oferecer apoio.

À professora Mara Helena Hutz, por sua fundamental contribuição.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre/FIPE pelo suporte financeiro.

Ao Weinmann Laboratório, pelo apoio logístico.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas.

À equipe do Laboratório de Análises Clínicas e Triagem Neonatal da Faculdade de Farmácia da UFRGS, representadas pelas farmacêuticas Ana Lúcia e Ana Stela.

Às bolsistas Ana Paula e Raquel, por me ajudarem a organizar as minhas bagunças.

Ao meu esposo Alessandro, pelos momentos de alegria que me proporciona.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
2.1. Hemoglobina.....	13
2.1.1. Estrutura.....	13
2.1.2. Fisiologia.....	14
2.1.3. Biossíntese da hemoglobina.....	16
2.1.4. Genética molecular da globina.....	17
2.1.4.1. Síntese das globinas do tipo $\alpha$ .....	18
2.1.4.2. Síntese das globinas do tipo $\beta$ .....	18
2.2. Talassemias.....	20
2.2.1. Talassemias do tipo beta e sua relação genótipo-fenótipo.....	21
2.2.1.1. Classificação das beta talassemias .....	22
2.2.1.1.1. Homozigota.....	22
2.2.1.1.2. Heterozigota.....	23
2.2.1.1.3. Intermediária.....	23
2.2.2. Base genética das beta talassemias.....	24
2.2.3. Distribuição epidemiológica mundial das beta talassemias.....	25
2.2.4. Distribuição genotípica mundial das beta talassemias.....	29
2.3. Formação do povo brasileiro.....	35
2.4. História da imigração italiana no Rio Grande do Sul.....	36
2.5. Estratégias no tratamento da beta talassemia.....	38
2.6. Importância do diagnóstico.....	40
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>43</b>
<b>ARTIGO (VERSÃO EM PORTUGUÊS) Identificação de Mutações para Beta Talassemia em uma população do Extremo Sul do Brasil.....</b>	<b>54</b>
<b>ARTIGO (VERSÃO EM INGLÊS) Identification of <math>\beta</math> Thal Mutations in Southern Brazilians.....</b>	<b>72</b>

<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>91</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### Letras gregas

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\delta$	Delta
$\epsilon$	Épsilon
$\zeta$	Zeta
$\varphi$	Psi

### Bases nitrogenadas

<b>A</b>	Adenina
<b>T</b>	Timina
<b>C</b>	Citosina
<b>G</b>	Guanina

### Índices hematimétricos

<b>VCM</b>	Volume corpuscular médio
<b>HCM</b>	Hemoglobina corpuscular média
<b>CHCM</b>	Concentração de hemoglobina corpuscular média
<b>RDW</b>	<i>Red cell distribution width</i>

### Referências geográficas

<b>AFR</b>	África Sub-Saara
<b>AMR</b>	Américas
<b>EMR</b>	Região do Mediterrâneo Leste
<b>EUR</b>	Europa
<b>SEAR</b>	Região do Sudeste Asiático



**WPR** Região do Pacífico Oeste

Unidades de medida

**g/dL** Gramas por decilitro

**fL** Fentolitro

**pg** Picograma

Biologia molecular da célula

**DNA** Ácido desoxiribonucléico

**RNA** Ácido ribonucléico

**RNAm** RNA mensageiro

$\text{G}_\gamma$  gama-glicina

$\text{A}_\gamma$  gama-alanina

**RNAm** RNA mensageiro

Fórmulas moleculares

**O<sub>2</sub>** oxigênio molecular

**CO<sub>2</sub>** dióxido de carbono

**2,3-DPG** 2,3-Difosfoglicerato

**HCO<sub>3</sub>** ácido carbônico

Hemoglobinas

**Hb** Hemoglobina

**Hb A** Hemoglobina A

**Hb A<sub>2</sub>** Hemoglobina A<sub>2</sub>

**Hb F** Hemoglobina Fetal

**Hb Gower-1** Hemoglobina Gower-1

**Hb Gower-2** Hemoglobina Gower-2

**Hb Portland** Hemoglobina Portland

**Hb S** Hemoglobina S

**Hb S/  $\beta$**  Heterozigoto para hemoglobina S e beta talassemia

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** - Algumas frequências representativas para os portadores do traço beta talassêmico.

**Tabela 2** - As 20 mutações gênicas mais frequentes, apresentadas em ordem de localização no gene.

**Tabela 3** - Eventos mutacionais responsáveis pela maioria dos casos de beta talassemia em alguns países ou regiões da Europa.

**Tabela 4** - Eventos mutacionais responsáveis pela maioria dos casos de beta talassemia em alguns países ou regiões da Ásia.

**Tabela 5** - Eventos mutacionais responsáveis pela maioria dos casos de beta talassemia em alguns países ou regiões do continente americano.

**Tabela 6** - Eventos mutacionais responsáveis pela maioria dos casos de beta talassemia em alguns países ou regiões do mediterrâneo leste.

**Tabela 7** - Status de desenvolvimento de novos agentes quelantes do ferro.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Estrutura da hemoglobina humana.

**Figura 2** – Curva de dissociação do oxigênio.

**Figura 3** – Diagrama da síntese das cadeias de globinas humanas de acordo com as diferentes fases do desenvolvimento.

**Figura 4** – Grupamento ou *cluster* dos genes  $\alpha$ .

**Figura 5** - Grupamento do gene  $\beta$ .

**Figura 6** - Distribuição global das talassemias relativa às áreas de maior frequência da doença.

## 1 INTRODUÇÃO

As alterações das hemoglobinas envolvem a síntese estrutural e quantitativa dos aminoácidos que compõe as diferentes cadeias de globinas, bem como as moléculas e enzimas que participam na formação do grupo heme. As alterações que envolvem as globinas se devem à modificação nos genes responsáveis pelo seqüenciamento e estrutura de cada tipo de polipeptídeo, bem como naqueles destinados à regulação quantitativa da síntese destes polipeptídeos, o que gera as chamadas talassemias (Naoum, 1997d). Estas constituem um grupo heterogêneo de doenças geneticamente determinadas, que além de se caracterizarem por um defeito na síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas da hemoglobina se manifestam sob várias formas clínicas, dependendo da cadeia globínica afetada e da intensidade de tal comprometimento (Olivieri, 1999).

Como resultado da revolução que se seguiu à tecnologia do DNA recombinante e ao seqüenciamento do genoma humano, a influência da genética na patogênese das doenças humanas atualmente domina a área das ciências biomédicas (Weatherall, 2000).

As doenças hereditárias das hemoglobinas são hoje um problema no mundo. Apesar do conhecimento sobre os mecanismos moleculares que tem influência na diversidade fenotípica destas doenças, muitas questões permanecem sem resposta, como por exemplo o papel das condições ambientais no curso clínico destas desordens (Weatherall, 2005). Desta forma, é de primordial importância que se conheça o perfil genotípico determinante destas doenças em populações específicas, visando o estabelecimento de programas de aconselhamento para casais de risco e o estabelecimento de políticas de saúde adequadas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

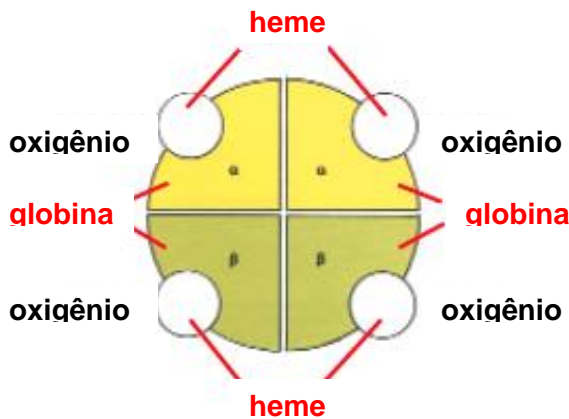
### 2.1 Hemoglobina

No Sistema Circulatório, os eritrócitos ou células vermelhas são responsáveis pelo transporte de oxigênio aos tecidos e dióxido de carbono aos pulmões, para sua eliminação. Dentro dos eritrócitos, este processo é mediado pela hemoglobina, uma proteína bastante heterogênea. Em 1866, Körben observou que a hemoglobina de recém-nascidos era fortemente resistente à desnaturação alcalina, em contraste ao comportamento da hemoglobina adulta. Hoje, sabe-se que existe considerável heterogeneidade na hemoglobina humana em todos os estágios de desenvolvimento (Harju et al, 2002).

#### 2.1.1 Estrutura

Todas as hemoglobinas humanas possuem estrutura tetramérica, constituindo-se de duas cadeias globínicas do tipo alfa ( $\alpha$ ) e duas do tipo beta ( $\beta$ ), ligadas a quatro átomos de ferro através do grupamento heme, conforme mostrado na figura 1. As hemoglobinas adultas e fetais possuem cadeias alfa ( $\alpha$ ) associadas com beta ( $\beta$ ), (Hb A,  $\alpha_2\beta_2$ ), delta ( $\delta$ ) (Hb A<sub>2</sub>,  $\alpha_2\delta_2$ ) ou gama ( $\gamma$ ) (Hb F,  $\alpha_2\gamma_2$ ), enquanto no embrião as cadeias zeta ( $\zeta$ ) se combinam com cadeias  $\gamma$  (Hb Portland,  $\zeta_2\gamma_2$ ) ou cadeias  $\epsilon$  (Hb Gower 1,  $\zeta_2\epsilon_2$ ) e cadeias  $\alpha$  e épsilon ( $\epsilon$ ) se combinam para formar a hemoglobina Gower 2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ). As cadeias  $\zeta$  e  $\epsilon$  são os correspondentes embrionários das cadeias adultas  $\alpha$  e  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , respectivamente (Weatherall, 1997; Harju et al, 2002).

**Figura 1** – Estrutura da hemoglobina humana. Adaptado de Eleftheriou, 2003.



A estrutura primária das cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  foi estabelecida nos anos 60. Na década de 70, algumas seqüências parciais das cadeias  $\zeta$  e  $\epsilon$  foram elucidadas, ficando claro que, enquanto as cadeias  $\zeta$  e  $\alpha$  possuíam pouca semelhança estrutural entre elas, as cadeias  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  estavam intimamente relacionadas estruturalmente. Alguns anos mais tarde, estudos genéticos mostraram que as cadeias de globina surgiram de uma globina ancestral por duplicações gênicas e subseqüentes divergências nestes genes duplicados (Weatherall, 1981a).

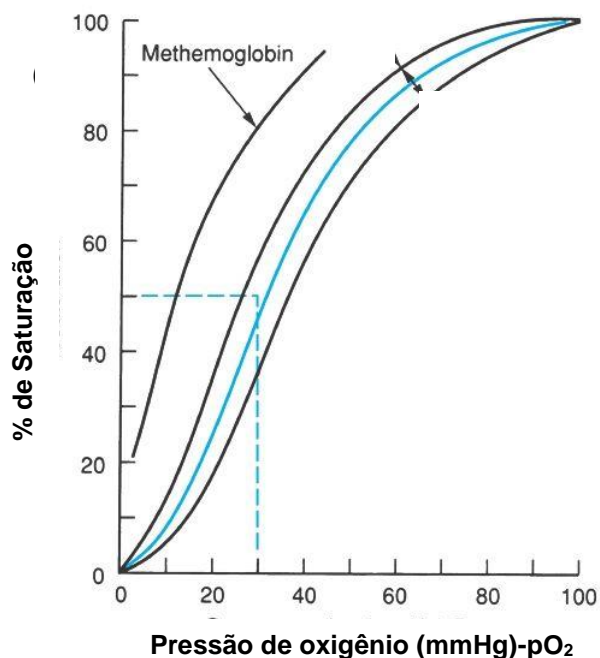
As subunidades globínicas apresentam estrutura tridimensional semelhante. A cadeia beta apresenta oito regiões helicoidais, nomeadas de A a H, totalizando 146 aminoácidos, e a cadeia alfa apresenta estrutura semelhante à cadeia beta, exceto pela falta do resíduo da hélice D, sendo constituída por 141 aminoácidos. O interior das subunidades é formado quase inteiramente por resíduos hidrofóbicos (não polares), que estão em contato com os resíduos adjacentes por forças de Van der Waals (Naoum, 1997a, Weatherall, 1981a).

### **2.1.2 Fisiologia**

Como classicamente descrita, a hemoglobina é o pigmento que confere ao sangue coloração vermelha e é responsável pela distribuição de oxigênio aos tecidos e órgãos do corpo (Luzatto, 2002). O transporte de oxigênio pela hemoglobina está baseado na capacidade dos seus átomos de ferro se combinarem reversivelmente com o oxigênio molecular. Em determinadas condições fisiológicas, o aumento da afinidade pelo oxigênio

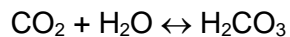
da hemoglobina humana entre saturações zero e total é de 500 vezes, correspondendo a uma energia de 3600 calorias por mol, fenômeno conhecido como energia livre, que é proveniente da interação entre os grupos heme (Naoum, 1997a). A chamada curva de dissociação do oxigênio da hemoglobina, ilustrada na figura 2, expressa a relação entre a percentagem de saturação e a  $pO_2$ . Esta curva possui forma sigmóide, o que em termos práticos quer dizer que a hemoglobina pode absorver e liberar grandes quantidades de oxigênio em resposta a pequenas mudanças na pressão parcial de oxigênio em condições fisiológicas, o que depende da interação entre os grupamentos heme - a oxigenação de um heme aumenta a reatividade dos demais, fenômeno conhecido como interação heme-heme. (Weatherall, 1981a). Desta forma, vê-se que a hemoglobina possui as características de uma proteína alostérica, ou seja, a combinação do oxigênio a um sítio de ligação facilita a ligação dos demais (Perella, 2003).

**Figura 2** – Curva de dissociação do oxigênio. Adaptado de Steinberg et al, 2005.



A afinidade da hemoglobina pelo oxigênio também é afetada pela ligação de outras moléculas como o 2-3-difosfoglicerato, que também é sensível a pequenas mudanças de pH, um fenômeno conhecido como efeito Bohr (Weatherall, 1981a). Em

1904, Bohr e seus colaboradores descobriram que a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio encontrava-se significativamente reduzida na presença de concentrações elevadas de dióxido de carbono, efeito este que se deve à diminuição do pH no interior dos eritrócitos nos tecidos periféricos. Assim, nos pulmões, a expulsão do dióxido de carbono possui um efeito inverso, ou Efeito Bohr alcalino, e que resulta no aumento da ligação entre a hemoglobina e o oxigênio. Estes eventos fisiológicos têm conseqüências favoráveis, pois à medida que o dióxido de carbono entra nos eritrócitos que circulam pelos capilares periféricos, forma-se rapidamente o ácido carbônico, por meio da ação da anidrase carbônica:



Pelo fato do ácido carbônico ter características de ácido fraco, sua contínua ionização resulta em queda do pH intra-eritrocitário, com conseqüente liberação do oxigênio. A deoxiemoglobina rapidamente se liga a prótons livres e suplementa o tamponamento intracelular necessário para manter a neutralidade elétrica (Naoum, 1997a).

### **2.1.3. Biossíntese da hemoglobina**

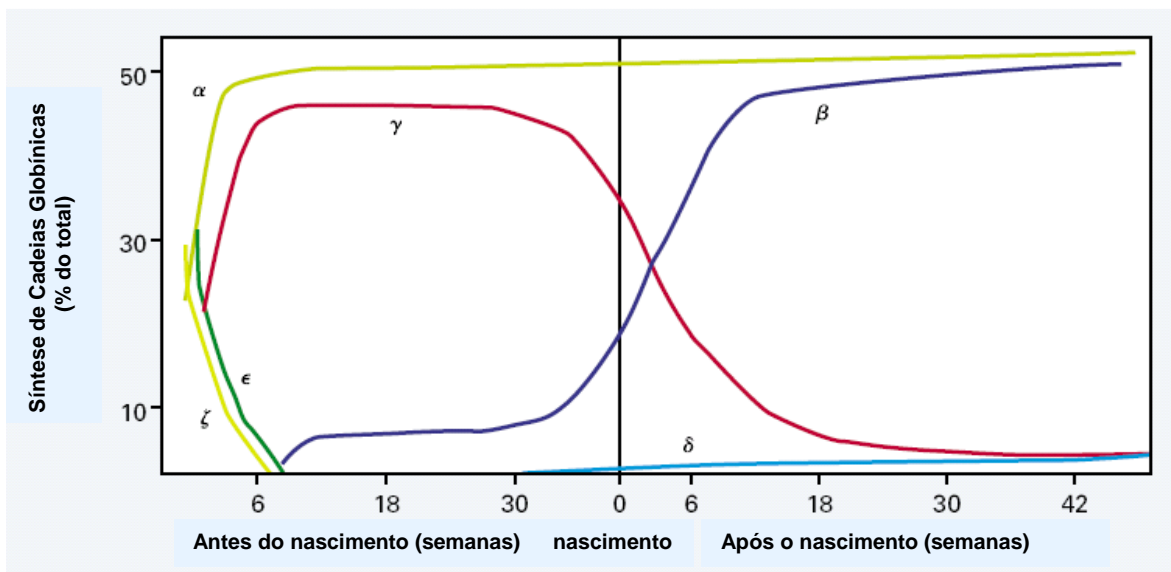
Em mamíferos, paralelamente ao desenvolvimento morfofisiológico que ocorre nas diferentes fases da gestação, são verificadas mudanças nos diferentes tipos de hemoglobinas característicos de cada espécie. Estas transformações têm sido consideradas como atividades adaptativas relacionadas à disponibilidade de oxigênio, durante o desenvolvimento do organismo (Naoum, 1997b).

Em 1972, Imgram estabeleceu duas linhagens celulares para os precursores eritrocitários: a primitiva, característica do saco vitelínico, e a definitiva, característica do período a partir do qual o fígado fetal é responsável pela produção de células eritróides (Weatheral, 1981b). A síntese de hemoglobinas embrionárias está restrita à linhagem de células primitivas e as de Hb F, A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> à linhagem de células definitivas. Os tipos de hemoglobinas predominantes no embrião são Gower 1 e 2 e Portland. Ao término deste período, não ocorre mais a síntese de hemoglobinas embrionárias, predominando a Hb F, que é produzida durante o período gestacional a partir da quarta semana, alcançando concentrações de até 90% entre a oitava e décima semana e permanecendo nestas concentrações até o nascimento. A Hb A é produzida pelo feto a partir da décima semana



e se mantém em concentrações próximas a 10% até o nascimento. A hemoglobina A<sub>2</sub>, formada por cadeias alfa e delta, começa a ser sintetizada na vigésima quinta semana e permanece em concentrações reduzidas até o nascimento, aumentando lentamente até haver estabilização de sua concentração em torno do sexto mês de vida (Naoum, 1997b). A figura 3 mostra as mudanças ocorridas na síntese das cadeias globínicas de acordo com as diferentes fases do desenvolvimento. Detalhes relativos à ontogenia das hemoglobinas serão ilustrados a seguir.

**Figura 3** – Diagrama da síntese das cadeias de globinas humanas de acordo com as diferentes fases do desenvolvimento. Adaptado de Olivieri, 1999.



#### 2.1.4 Genética molecular da globina

Nos últimos 50 anos, o estudo da síntese da hemoglobina têm servido de base para o entendimento do controle da expressão gênica durante a hematopoiese. A descoberta de como os genes  $\alpha$  e  $\beta$  são normalmente regulados e o conhecimento do efeito das mutações que causam a diminuição da produção destas cadeias tem papel fundamental na elucidação dos mecanismos de ativação e desativação de genes nas células hematopoiéticas (Higgs, 2004). A seguir, serão abordados os principais aspectos relacionados à síntese de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , sob o ponto de vista genético.

#### 2.1.4.1 Síntese das globinas do tipo $\alpha$

Os genes responsáveis pela síntese das cadeias de globina  $\alpha$  estão localizados em dois *clusters* ou agrupamentos gênicos. O agrupamento ou *cluster* de genes  $\alpha$  está localizado próximo ao telômero do cromossomo 16, 16 p13.3, constituindo-se dos genes  $\zeta$ , pseudogene  $\xi$  ( $\varphi\xi$ ), pseudogene  $\alpha$  ( $\varphi\alpha$ ), e dois genes  $\alpha$ , chamados de  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ . A distância em relação ao telômero mostra variações polimórficas, variando de 170 a 430 Kb (Higgs, 2004), conforme mostrado na figura 4.

**Figura 4** – Grupamento ou *cluster* dos genes  $\alpha$  (os pseudogenes não estão representados). A linha pontilhada indica o local das variações polimórficas em relação ao telômero. Adaptado de Higgs, 2004.

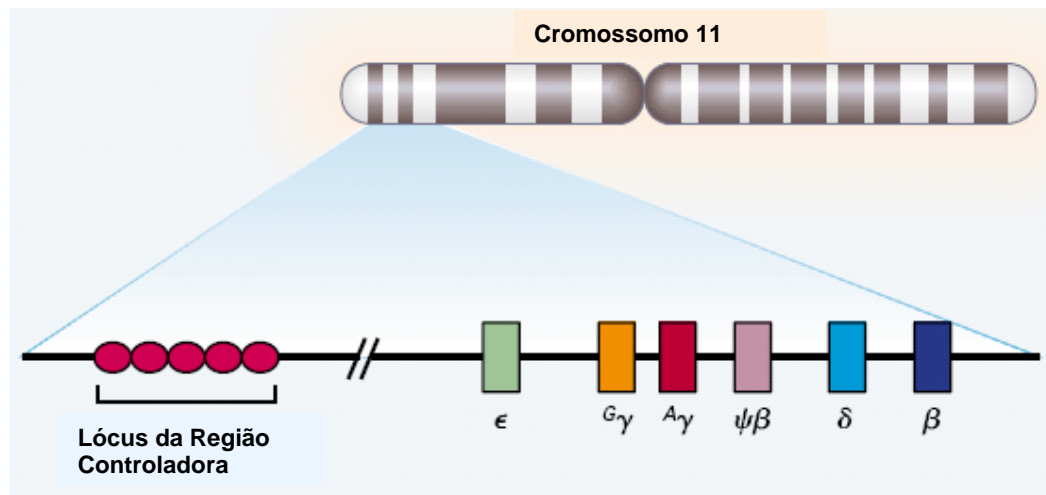


#### 2.1.4.2 Síntese das globinas do tipo $\beta$

O agrupamento dos genes  $\beta$  está localizado no braço curto do cromossomo 11 e constitui-se dos genes  $\epsilon$ ,  $\gamma$  (gama-glicina),  $\gamma$  (gama-alanina), pseudogene  $\varphi\beta$ , genes  $\delta$  e  $\beta$ , conforme representado na figura 5. Os pseudogenes são genes não funcionais homólogos aos genes da globina, que são transcritos, mas não são traduzidos. Além deste cinco genes funcionais, uma região denominada locus da região controladora, composta por cinco sítios sensíveis à DNase (HS) constitui o locus da beta globina, sendo estes genes arranjados na mesma ordem de sua expressão durante a ontogenia, 5' -  $\epsilon$  -  $\gamma$  -  $\gamma$  -  $\delta$  -  $\beta$  - 3' (Harju et al, 2002, Ikuta et al, 1996). Todos os genes da globina possuem três seqüências codificadoras (éxons) e duas seqüências não codificadoras (íntrons), que são flanqueadas por seqüências não codificantes nas terminações 5' e 3' (Weatherall, 1997). O processo de transcrição do gene se inicia quando fatores de transcrição se ligam à região promotora, que consiste de aproximadamente 100 pares de bases que precedem o ponto imediatamente anterior ao início da transcrição. Os promotores do gene  $\beta$  são três elementos regulatórios em *cis*, o TATA Box, o CCAAT Box e uma seqüência CACC

duplicada. O gene inteiro, incluindo os íntrons, é transcrito. A transcrição é o processo pelo qual ocorre a síntese de RNA a partir de uma fita simples de DNA, pela ação da RNA polimerase, sendo este processo controlado pela interação entre genes e fatores de transcrição que se ligam às suas regiões promotoras e *enhancers*, papel que no caso do gene  $\beta$  é exercido pelo locus da região controladora (LCR), constituído de quatro sítios hipersensíveis à Dnase, chamados HS1, HS2, HS3 e HS4, sendo o HS2 provavelmente o mais importante *enhancer* na síntese de cadeias globínicas (Bungert, 1999; Weatherall, 1995).

**Figura 5** - Grupamento do gene  $\beta$ . Adaptado de Olivieri, 1999.



Durante o desenvolvimento, ocorrem duas mudanças na expressão do gene da globina, refletindo mudanças relativas às necessidades de oxigênio pelo feto. O gene  $\epsilon$  é expresso durante os seis primeiros meses de gestação, nas células primitivas nucleadas do saco vitelínico, enquanto os genes  $\gamma$  e  $\beta$  encontram-se silenciados (eritropoiese embrionária ou primitiva). Durante a primeira mudança, a expressão dos genes  $G\gamma$  e  $A\gamma$  é ativada nas células hematopoiéticas definitivas do fígado fetal (eritropoiese fetal definitiva). O gene  $\epsilon$  é silenciado concomitantemente à ativação do gene  $\gamma$ . Durante a segunda mudança, logo após o nascimento, o gene  $\beta$ , e em menor extensão o gene  $\gamma$ , são ativados na medula óssea e no baço (eritropoiese adulta definitiva). Quando o gene  $\beta$  é ativado, o gene  $\gamma$  é reciprocamente silenciado, conforme já ilustrado na figura 3 (Harju et al, 2002).

## 2.2 Talassemias

As talassemias compreendem uma família de distúrbios genéticos da síntese de hemoglobina, caracterizadas por uma redução parcial ou total da produção de uma ou mais cadeias polipeptídicas de globina. Essa redução provoca um desequilíbrio entre os diferentes tipos de globina, podendo resultar no desenvolvimento de uma anemia microcítica e hipocrômica. De acordo com a cadeia polipeptídica de globina afetada, as talassemias podem ser classificadas como: alfa, beta, delta, delta-beta, e gama-delta-beta. Do ponto de vista de Saúde Pública, as talassemias alfa e beta têm maior importância pelo fato de serem mais comumente encontradas (Weatherall, 2001).

A beta talassemia, uma das doenças monogênicas mais comumente identificadas e estudadas por várias décadas, constitui um grupo heterogêneo de distúrbios genéticos da síntese de hemoglobina com origem na região do Mediterrâneo, encontrando-se também no sul da China, sudeste da Ásia, subcontinente indiano, Malásia, Indonésia e para grupos de população negra (Thalassaemia International Federation, 2000; Rund, 2005; Cao, 2002). Em virtude do fluxo de migração das populações, a beta talassemia pode ser encontrada em todos os continentes, estimando-se que 1,67% da população mundial seja portadora de um gene alterado para alfa ou beta talassemia, sendo a taxa de homocigotos ou heterocigotos compostos para estas alterações estimada em 0,44 por 1000 nascimentos. A maioria dos pacientes com beta talassemia apresenta anemia grave dependente de transfusões sanguíneas, o que leva muitos países a estabelecerem programas de controle baseados em triagem, aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal (Rund, 2005).

Nos países em desenvolvimento, a melhoria das condições sócio-econômicas aliada à diminuição da mortalidade infantil devido à infecção e má-nutrição, está permitindo que crianças com talassemia que morriam muito cedo sobrevivam e necessitem de tratamento adequado (Weatherall, 2001). Este tratamento vai desde as transfusões sanguíneas e terapia de quelação do ferro até suporte psicológico, como já ocorre normalmente com outras doenças crônicas, pois crianças com talassemia apresentam maior risco de desenvolver problemas psicossociais, havendo forte impacto para a criança e para a família, em termos de qualidade de vida (Thanarattanakorn, 2003).

Atualmente, mediante o emprego da tecnologia molecular no estudo da base genética das talassemias, estratégias de compreensão dos mecanismos da doença têm

sido apresentadas fornecendo suporte para um correto diagnóstico e tratamento mais eficaz.

No Brasil, os tipos de talassemia mais prevalentes são as talassemias alfa e beta que se manifestam em heterozigose, homozigose e formas interativas. O número de indivíduos afetados varia segundo a origem étnica da população analisada (Naoum, 1987).

### **2.2.1 Talassemias do Tipo Beta e sua relação genótipo-fenótipo**

Mais de 200 diferentes mutações no gene da beta globina podem ocasionar beta talassemia, com ausência ( $\beta^0$  talassemia) ou redução ( $\beta^+$  talassemia) da expressão das cadeias de beta globina (Rund, 2005; Olivieri, 1999, Harju et al, 2002, Weatherall, 2001). Isto resulta em uma diminuição na síntese da cadeia de beta globina e conseqüente excesso da cadeia alfa, que se combina com as cadeias delta e gama, contribuindo para o aumento das hemoglobinas  $A_2$  e Fetal, respectivamente (Weatherall, 1997).

As beta talassemias são doenças clinicamente heterogêneas em função da ampla variedade de alterações gênicas que ocasionam o desequilíbrio na síntese de cadeias globínicas, ou seja, apenas a alteração em um locus específico não é suficiente para explicar a variabilidade fenotípica de indivíduos com o mesmo genótipo, sugerindo a existência de outros moduladores genéticos que possam explicar este fato (Beutler, 2001).

Desta forma, o grau de manifestação clínica desta alteração é extremamente variável, podendo apresentar-se desde uma forma mais grave, como na beta talassemia maior como em um quadro clínico mais leve, talassemia heterozigótica, onde o indivíduo é geralmente assintomático, podendo apresentar desde uma leve anemia hipocrômica com hemácias microcíticas e concentração aumentada de hemoglobina  $A_2$  até um quadro hematológico silencioso (Bianco et al, 1997), embora já tenham sido descritos fenótipos que parecem estar ligados a um padrão de herança dominante, com a presença de um quadro clínico grave mesmo no estado heterozigoto (Weatherall, 1995; Olivieri, 1999). A talassemia intermediária apresenta manifestações clínicas moderadas e os genótipos podem ser homozigotos, heterozigotos ou heterozigotos compostos (Cao, 2002).

O modo de herança das talassemias, assim como de outras alterações genéticas da hemoglobina, é autossômico, e o termo dominante ou recessivo é difícil de ser

aplicado, porque alguns heterozigotos apresentam distúrbios clínicos, ao passo que outros não. No entanto, a beta talassemia é considerada de herança autossômica recessiva, porque são necessários dois genes anormais da beta globina para produzir o fenótipo clinicamente detectável na maioria dos casos (Naoum, 1997d).

### **2.2.1.1 Classificação das Beta Talassemias**

#### **2.2.1.1.1 Homozigota**

A beta talassemia homozigota ou beta talassemia major é resultante do estado homozigoto ou heterozigoto composto, tanto do tipo beta mais quanto do tipo beta zero. O indivíduo apresenta grave anemia hemolítica devido à ausência ou deficiência acentuada na produção de cadeias beta. O excesso de cadeias de alfa globina precipita nas células precursoras das hemácias, levando à sua destruição precoce. Este processo causa uma anemia grave, que ocasiona o aumento da produção de eritropoetina e expansão da medula óssea, além de deformidades ósseas, esplenomegalia, e retardo no crescimento (Luzzato, 2002).

Crianças afetadas pela beta talassemia maior sofrem de anemia desde o primeiro ano de vida, a partir do período em que a produção de cadeias beta se estabiliza por volta do oitavo mês, e o resultado do desequilíbrio de síntese se manifesta por efeitos fisiopatológicos. As principais causas de óbito são infecções ou insuficiência cardíaca, devido à deposição de ferro no miocárdio e em vasos sangüíneos, decorrente da extensa e prematura destruição dos eritrócitos, tanto daqueles que são continuamente produzidos para suprir a anemia hemolítica, quanto dos recebidos em transfusões sangüíneas freqüentes e necessárias, bem como da absorção gastrointestinal aumentada do ferro recebido pela dieta alimentar (Weatherall, 1997). Assim, a utilização de quelantes de ferro faz-se necessária para ajudar a eliminar o excesso desse metal no organismo (Cohen, 2004). Detalhes relativos ao tratamento da doença serão abordados adiante.

### **2.2.1.1.2 Heterozigota**

A talassemia beta heterozigota caracteriza-se geneticamente pela herança de um único componente alterado. Nas formas beta zero e beta mais, a redução da taxa de síntese da beta globina é menor, mas o suficiente para causar discreto grau de anemia microcítica e hipocrômica com aumento de resistência osmótica dos glóbulos vermelhos. As mutações são indistinguíveis por exames laboratoriais de rotina. Entretanto, com a utilização de técnicas de biologia molecular, pode-se diferenciar esses heterozigotos (Naoum, 1997d).

### **2.2.1.1.3. Intermediária**

Estima-se que 5 a 10% dos pacientes homozigotos para uma das mutações que afetam a síntese das cadeias beta apresentam quadro clínico e hematológico de gravidade intermediária entre as beta talassemias maior e menor. A designação de talassemia intermediária aplica-se a pacientes com um quadro clínico mais ameno que o da beta talassemia maior, apresentando aumento do número dos reticulócitos e em alguns casos dependente de transfusão sanguínea (Cançado, 1997).

A beta talassemia intermediária pode decorrer da herança de diferentes mutantes de beta talassemia ou da interação das talassemias alfa e beta, com redução concomitante de ambas as cadeias globínicas, o que diminui o número de cadeias desemparelhadas e propicia uma redução na taxa de destruição dos eritrócitos em comparação com as formas graves de talassemias. A beta talassemia intermediária pode decorrer também, de interações da beta talassemia com alguns tipos de hemoglobinas variantes, particularmente a Hb E, Hb S e Hb C (Thalassaemia International Federation, 2000). A variabilidade do grau de manifestação clínica desta condição resulta da grande heterogeneidade em nível molecular. Este grupo de pacientes apresenta índices hematológicos que podem variar entre aqueles encontrados no estado heterozigoto e homozigoto. A maioria dos pacientes com talassemia intermediária apresenta-se como homozigoto ou heterozigoto composto para beta talassemia. A identificação dos genótipos capazes de compensação molecular torna possível prever o curso clínico da doença. Já foram identificados mecanismos moleculares capazes de reduzir a razão de cadeias  $\alpha$ : não  $\alpha$  ( $\beta+\gamma$ ), que está relacionada com o fenótipo. Um exemplo disto é a herança em

homozigose ou dupla heterozigose de uma mutação leve ou silenciosa para beta talassemia (Cao, 2002).

### 2.2.2 Base genética da Beta Talassemia

A beta talassemia pode ser causada por mutação de ponto, deleção ou inserção de poucos nucleotídeos, resultando numa diminuição da transcrição, incapacidade de iniciação da tradução, processamento anormal de RNA, “*frameshift*” (mudança do quadro de leitura), terminação prematura e produção de hemoglobinas instáveis (Kazazian, 1990).

Os principais defeitos são:

a) Mutações que afetam a transcrição: Substituição de nucleotídeos no "TATA box" e nas seqüências CACACC distal e proximal, todos na região promotora 5' do gene beta. Estão geralmente associadas a fenótipos moderados com diminuição da transcrição.

b) Mutantes que alteram o RNAm: Mutações que afetam a estabilidade do RNAm podem estar tanto em alterações no capuz da extremidade 5', como na região de clivagem do RNAm e no sinal de poliadenilação AATAAA da extremidade 3'. As mutações no capuz que alteram o primeiro resíduo afetam a função do RNAm, reduzindo a transcrição e retardando o processo de formação do capuz, alterando dessa forma, a estabilidade do RNAm. Do mesmo modo, mutações na extremidade 3' reduzem acentuadamente a clivagem do RNAm produzindo moléculas mais longas e instáveis (Kazazian, 1990).

c) Mutações que afetam a tradução : Mutações sem sentido, que formam códons de terminação na região codificadora interrompendo a tradução, e mutações de sentido trocado, originando códons para aminoácidos alternativos. Essas cadeias são degradadas logo após sua síntese devido à sua grande instabilidade, acarretando um estado muito similar ao produzido por redução de cadeias beta (Kazazian, 1990).

d) Deleções produzindo beta talassemia: Um grande número de deleções afetando o gene da beta globina têm sido observado, muitas envolvendo os genes delta e beta simultaneamente, como em alguns casos de Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal e talassemia delta-beta (Kazazian, 1990).



Como os defeitos que envolvem várias desordens genéticas permanecem incompreendidos, está claro que pacientes com o mesmo genótipo podem apresentar condições clínicas diferentes, mesmo no caso de doenças monogênicas. A diversidade fenotípica das beta talassemias é o exemplo de como se pode gerar um amplo espectro de manifestações clínicas relacionado a uma doença. O fator mais dependente e preditivo do fenótipo da doença é a natureza da mutação no locus da beta globina. Entretanto, relacionar o fenótipo com o genótipo é complicado, pela complexa interação de fatores ambientais e outros fatores genéticos em níveis secundários e terciários, alguns ainda não identificados (Thein, 2002).

### **2.2.3 Distribuição epidemiológica mundial das beta talassemias**

Segundo a Organização Mundial de Saúde, 7% da população mundial é portadora de genes determinantes de talassemias alfa e beta (Weatherall, 2001; Salzano, 2002). As regiões de maior incidência da doença situam-se em um cinturão constituído pelo Mar Mediterrâneo e partes da África, Oriente Médio, sub-contidente indiano, sudeste asiático, Melanésia e algumas ilhas do pacífico, conforme ilustrado na figura 6. A frequência dos heterozigotos nestas áreas varia de 1 a 20% e é responsável por 95% dos nascimentos de crianças afetadas que ocorrem anualmente (Vichinsky et al, 2005). Evidências mostram que a alta frequência de beta talassemia nas regiões abrangidas pelos trópicos reflete a vantagem do heterozigoto contra o plasmódio da malária, o que já foi demonstrado também para as alfa talassemias e para portadores do gene para anemia falciforme (Olivieri, 1999; Weatherall, 2001).

**Figura 6** - Distribuição global das talassemias relativa às áreas de maior freqüência da doença. Adaptado de Weatherall, 2001.



Apesar desta condição genética ocorrer com maior freqüência nas regiões tropicais, os movimentos populacionais migratórios favoreceram a sua disseminação para outras áreas, encontrando-se hoje indivíduos portadores do gene para talassemias e outras desordens das hemoglobinas na Europa, Américas e Austrália (Weatherall, 2001; Angastiniotis e Modell, 1998).

As informações relativas à epidemiologia das beta talassemias são de difícil obtenção, pois existem diferenças na freqüência de portadores até mesmo dentro de um mesmo país. Na Itália, por exemplo, a freqüência dos portadores varia de 1-2% no norte a 12% nas regiões da Sardenha e Ferrara, ficando a média em torno de 5%. Além disso, há a co-existência de vários grupos étnicos em alguns países, onde a doença foi importada pelos imigrantes, como no norte da Europa e Estados Unidos. Em Oman, onde houve a migração da tribo Beluschi, vinda da região do Irã e Paquistão, existem altos percentuais de portadores (10%) em relação à população indígena árabe (1-2%). É

primordial aqui salientar a importância do mapeamento da frequência de portadores, dado de maior importância para a detecção de grupos de risco e o estabelecimento de programas de aconselhamento adequados (Angastiniotis e Modell, 1998).

Sendo assim, não são disponíveis dados epidemiológicos precisos para todos os países do mundo e outros poucos foram totalmente mapeados, com suas diferenças regionais identificadas. A Organização Mundial da Saúde organiza estes dados em seis áreas: AFR (África Sub-Saara), AMR (Américas), EMR (Região Mediterrânea Leste), EUR (Europa), SEAR (Região Sudeste Asiático) e WPR (Região do Pacífico Oeste). A tabela 1 mostra a frequência de portadores para os principais países representantes destas regiões.

**Tabela 1** - Algumas frequências representativas para os portadores do traço beta talassêmico. Adaptado de Weatherall, 2001

<b>Localidade</b>	<b>Frequência de portadores (%)</b>
Itália	0,5-19
Sardenha	11-19
Chipre	15-17
Grécia	6-19
Turquia	1-11
Jordânia	3,5
Arábia Saudita	1-2
Israel	1-20
Irã	4-5
Azerbaijão	6
Índia	0,3-15
Algéria	3
Egito	2-4
Sudão	5
Mali	3
Libéria	1-12
Nigéria	1
Tailândia	1-11
Laos	6
Cambodja	3
Vietnã	0-4
Sul da China	2
Indonésia	0-11

No continente americano, a frequência dos genes determinantes de beta talassemia, como já comentado, está intimamente ligada à formação étnica do seu povo. Nas últimas três décadas, houve um aumento de 2000% na entrada de imigrantes asiáticos nos Estados Unidos, com diminuição da entrada de imigrantes da região do Mediterrâneo. Como consequência deste fato, o padrão de distribuição genotípica, assim como a média de idade dos afetados mudou. Hoje, a imigração massiva desta população de alto risco é a grande responsável pelo nascimento de crianças afetadas, observando-se mais casos de jovens e adultos afetados de origem mediterrânea (Vichinsky et al, 2005).

O México, que tem a segunda maior população entre os países latino-americanos, tem na talassemia beta heterozigota a sua hemoglobinopatia mais prevalente (0,1%). A Costa Rica, por ter um dos centros de hemoglobinopatias mais avançados entre os países da América Central, detectou 0,2% de talassemia beta heterozigota em estudos populacionais. Outros países latino-americanos como o Uruguai, Bolívia, Equador, Paraguai, Peru e Chile, carecem de informações a respeito da prevalência de hemoglobinopatias em suas populações (Naoum, 1997c).

Na Argentina, a colonização espanhola foi a principal responsável pela introdução do gene para beta talassemia no país, contribuindo para isto também os processos migratórios ocorridos entre os séculos 19 e 20, por países de base mediterrânea, principalmente Itália e Espanha (Bragós et al, 2000; Rosseti, 2004). Um estudo realizado com 4000 doadores de sangue nas cidades localizadas nos arredores de Buenos Aires mostrou uma incidência de 0,8% de portadores beta talassêmicos (Abreu, 1983).

Em uma revisão de dados sobre hemoglobinopatias no Brasil, Zago e colaboradores mostraram que as beta talassemias estão representadas entre os distúrbios mais frequentes, tendo sido introduzidas predominantemente pelos imigrantes italianos (Zago, 1983). Em termos de frequência, os percentuais variam grandemente de um estado para outro. O maior estudo de prevalência e distribuição de hemoglobinopatias realizado no Brasil analisou amostras de 55.217 indivíduos em quarenta cidades e provenientes de centros de saúde, escolas e bancos de sangue. Neste estudo, 3,08% dos indivíduos tinham hemoglobinas anormais desdobradas em variantes moleculares (2,49%), talassemias (0,53%) e alterações induzidas pela formação de meta-hemoglobinas (0,06%) (Naoum, 1987). Em estudo realizado por Freitas e Rocha (1983) com 704 caucasóides de Porto Alegre, encontrou-se uma frequência de 1,1% de heterozigotos para beta talassemia.

#### **2.2.4 Distribuição genotípica mundial das beta talassemias**

Em revisão da literatura, Huisman e colaboradores identificaram e classificaram os alelos mutantes mais freqüentes para beta talassemia, demonstrando que 20 mutações (tabela 2) são responsáveis por cerca de 80% dos casos desta alteração. As tabelas 3-6 mostram os eventos mutacionais responsáveis pela maioria dos casos de beta talassemia em alguns países ou regiões do mundo, classificadas segundo a Organização Mundial da Saúde (Huisman, 1997). Dados referentes à Região África sub-Saara não foram encontrados na presente revisão.

Como já mencionado anteriormente, a freqüência dos portadores para o gene da beta talassemia é de difícil obtenção, variando grandemente até mesmo dentro de cada país, tribo ou povoado, da mesma forma que a sua distribuição genotípica. Na Espanha, por exemplo, existe maior incidência da mutação do Codon 39, C>T na região de Valença, Barcelona, Granada e Maiorca, enquanto na região central, sul e oeste há um predomínio da mutação IVS-I-110, G> A. (Perez et al, 1998).

**Tabela 2** - As 20 mutações gênicas mais freqüentes no mundo, apresentadas em ordem de localização no gene. Adaptado de Huisman, HJ, 1997.

<b>Alelo</b>	<b>populações</b>
-88 C>T	negros americanos
-31 A>G	japoneses
-29 A>G	negros americanos
-28 A>G	chineses, tailandeses e israelenses
Codon 6 -A	africanos do norte
Codon 8 -AA	Oriente Médio
Codons 8/9 +G	Oriente Médio e indianos
Codon 17 A>T	chineses e tailandeses
Codon 19 A>G	tailandeses
IVSI-1 G>A	africanos do norte, italianos, gregos, balcãs e oeste europeu
IVSI-1 G>T	indianos e tailandeses
IVSI-5 G>C	indianos, tailandeses, malaios e Oriente Médio
IVSI-6 T>C	italianos, gregos, balcãs e oeste europeu (Portugal)
IVSI-110 G>A	italianos, gregos, chiprianos, balcãs, israelenses, libaneses, africanos do norte e oeste europeu
Codon 39 C>T	italianos, gregos, balcãs, africanos do norte, israelenses, oeste europeu e Oriente Médio
Códons 41/42 -TTCT	chineses, tailandeses, indianos e malaios
Codon 44 -C	israelenses e Oriente Médio
Codon 90 G>T	japoneses
IVSII-1 G>A	israelenses, Oriente Médio, japoneses e turcos
IVSII-654, C>T	chineses, tailandeses e japoneses
IVSII-745, C>G	italianos, gregos e turcos
619 pares de bases deletados	indiana, paquistanesa

Fonte: <http://globin.cse.psu.edu/html/huisman/thals/tables/table02.html>

**Tabela 3** - Eventos mutacionais responsáveis pela maioria dos casos de beta talassemia em alguns países ou regiões da Europa.

<b>País ou Região</b>	<b>Mutação</b>	<b>% dos beta talassêmicos</b>	<b>Referência</b>
Alemanha	Códon 39 C→T	50	Laig et al, 1990; Flatz et al, 1999; Vetter et al, 1997; Schwarz et al, 1997
	IVSI-5 G>T	7,5	
	IVSI-110 G>A	7,5	
	IVSII-1 G>A	5	
	Total →	70	
Espanha	IVSI-1 G>A		Villegas et al, 2001
	IVSI-6 T>C		
	IVSI-110 G>A		
	Códon 39 C>T		
	Códon 8/9 (+G)		
	Total →	86,6	
Itália	<i>Sardenha</i>		Cao et al, 1991; Rosatelli et al, 1992a; Rosatelli et al, 1992b
	Códon 39 C>T	95,7	
	Total →	95,7	
	<i>Calabria</i>		Magro et al, 1995
	Códon 39 C>T	34,33	
	IVSI-110 G>A	19,03	
	IVSI-6 T>C	17,91	
	IVSI-1 G>A	6,72	
	Total →	77,99	
	<i>Sicília</i>		Schiliró et al, 1995
	Códon 39 C>T	34,52	
	IVSI-110 G>A	24,11	
	IVSI-6 T>C	15,37	
	IVSI-1 G>A	9	
	Total →	83	
Polónia	IVSI-6 T>C	32	Zdebska et al, 2006
	IVSII-745 C>G	30	
	IVSII-1 G>A	21	
	IVSI-1 G>A	4	
	Códon 6 (-A)	4	
	Códon 39 C>T	4	
	IVSI-110 G>A	2	
	Total →	97	
Grécia	IVSI-110 G>A	42,5	Kattamis et al, 1990; Georgiou et al, 2003
	Códon 39 C>T	17	
	IVSI-1 G>A	13,2	
	IVSI-6 T>C	7,2	
	IVSII-745 C>G	6,9	
	Total →	86,8	
Romênia	IVSI-110 G>A	31,25	Talmaci et al, 2004
	Códon 39 C>T	25	
	IVSII-745 C>G	15,6	
	IVSI-1 G>A	12,5	
	Total →	84,3	
Portugal	Códon 39 C>T	38	Faustino et al, 1999
	IVSI-1 G>A	28	
	IVSI-6 T>C	17	
	IVSI-110 G>A	10	
	Total →	93	

**Tabela 4** - Eventos mutacionais responsáveis pela maioria dos casos de beta talassemia em alguns países ou regiões da Ásia.

<b>País ou Região</b>	<b>Mutação</b>	<b>% dos beta talassêmicos</b>	<b>Referência</b>
Hong Kong	Codons 41/42, -TTCT	40	Lau et al, 1997
	IVSII-654 C>T	33	
	-28 A>G	14	
	Total →	87	
China	IVSII-654 C>T	87	Ko et al, 1998a; Zeng , 2001
	Codons 41/42, -TTCT		
	Códon 17 A>T		
	-28 (A>G)		
Total →	90		
Filipinos de Taiwan	Deleção filipina (27/59) códon 67(-TG) Hb E	45,8	Ko et al, 1998b
	Total →	92	
Vietnan	Códon 17 A>T	30	
	Codons 41/42, -TTCT	22	
	Códon 95 (+A)	9	
	Total →	61	
India	IVSI-5 G>C	34,1	Chakrabarti et al, 2005;
	619 pb deletados	21	
	IVSI-1 G>A	15,8	
	códon 8/9 (+G)	12,1	
	Codons 41/42, -TTCT	8,7	
	Total →	91,7	
Koréia	Initiation codon, A <u>T</u> G>A <u>G</u> G	23,4	Park, 2002a;
	Códon 17 A>T	21,2	
	IVSII-1 G>A	12,7	
	Total →	57,3	



**Tabela 5** - Eventos mutacionais responsáveis pela maioria dos casos de beta talassemia em alguns países ou regiões do continente americano.

<b>País ou Região</b>	<b>Mutação</b>	<b>% dos beta talassêmicos</b>	<b>Referência</b>
Guadalupe	-29 (A>G)		Romana et al, 1996
	IVSI-5 G>C		
	IVSII-1 G>A		
	IVSI-5 G>C		
	Total→	77,6	
Cuba	Códon 39 C>T	30,5	Muniz et al, 2000
	-29 (A>G)	13,4	
	IVSI-110 G>A	8,5	
	IVSII-1 G>A	8,5	
	Total→	60,9	
Argentina	Códon 39 C>T	47	Roldan et al, 1997
	IVSI-110 G>A	22,4	
	IVSI-1 G>A	9,4	
	IVSI-6 T>C	5,9	
	IVSII-1 G>A	3,5	
	-87 C>G	2,3	
	Total→	90,5	
Brasil	São Paulo		Bertuzzo, 1997
	Códon 39 C>T	64	
	IVSI-110 G>A	20	
	IVSI-1 G>A	7	
	IVSI-6 T>C	5	
	Total→	96	
	Pernambuco		Araujo et al, 2003
	IVSI-6 T>C	62,8	
	IVSI-1 G>A	15,1	
	IVSI-5 G>C	9,3	
	IVSI-110 G>A	8,2	
	Códon 39 C>T	3,5	
	Total→	98,9	

**Tabela 6** - Eventos mutacionais responsáveis pela maioria dos casos de beta talassemia em alguns países ou regiões do mediterrâneo leste.

Região	Mutação	% dos beta talassêmicos	Referência
Síria	IVSI-110 G>A		Kyriacou et al, 2000
	IVSI-1 G>A		
	códon 5 (-CT)		
	-30 (T>A)		
	Códon 39 C>T		
	IVSI-6 T>C		
	IVSII-1 G>A		
	códon 15 (TGG>TAG)		
	Total→	75	
Libano	IVSI-110 G>A		Makhoul et al, 2005
	IVSI-1 G>A		
	IVSI-6 T>C		
	códon 5		
	códon 29 C>T		
	Total→	86	
Jordânia	IVSI-110 G>A	22	Sadiq, 1994
	IVSII-1 G>A	19,8	
	IVSII-745 C>G	12	
	códon 37 G.A	8,8	
	IVSI-5 G>C	5,5	
	IVSI-1 G>A	6,6	
	IVSII-1 G>A	6,6	
	Total→	81,3	
Israel	IVSI-110 G>A	26,4	Filon et al, 1994
	IVSI-6 T>C	14,7	
	IVSI-1 G>A	8	
	Códon 39 C>T	8	
	Códon 37 G>A	7,4	
	IVSII-1 G>A	7	
	Total→	71,5	
Faixa de Gaza	IVSI-110 G>A	37,5	Filon et al, 1995
	IVSI-1 G>A	20	
	Códon 39 C>T	11,5	
	códon 5 (-CT)	10	
	IVSI-6 T>C	7,5	
	Total→	86,5	
Arábia Saudita	IVSI-110 G>A	22	el-Hazmi, 1995
	IVSI-1 G>A	7	
	Códon 39 C>T	20	
	IVSI-5 G>C	10	
	IVS-I 3' end (-25)	14	

**Tabela 6 (cont)** - Eventos mutacionais responsáveis pela maioria dos casos de beta talassemia em alguns países ou regiões do mediterrâneo leste.

	IVSII-1 G>A	15	
	Total→	88	
Kwait	IVSII-1 G>A	29	Adekile et al, 1994
	IVSI-5 G>C	18,8	
	IVSI-1 G>A	7,3	
	Códon 39 C>T	7,3	
	IVSI-6 T>C	7,3	
	Total→	69,7	
Egito (Alexandria)	IVSI-110 G>A	62	Omar et al, 2005
	IVSI-6 T>C	7	
	IVSI-1 G>A	4	
	Total→	73	
Tunísia	Códon 39 C>T	43,8	Chouk et al, 2004;
	IVSI-110 G>A	10,8	Fattoum et al, 2004
	Total→	54,6	
Paquistão	IVSI-5 G>C	37,7	Khan, 1998
	códon 8/9 (+G)	21,1	
	619 pb deletados	12,4	
	IVSI-1 G>A	9,5	
	Total→	80,7	
Chipre	IVSI-110 G>A	80	Baysal et al, 1992

### 2.3 Formação do povo brasileiro

Os ameríndios originalmente povoaram a América do Sul no período Pleistoceno. Séculos depois, quando os portugueses “descobriram” o Brasil, em 1500, este era habitado por cerca de 2,4 milhões de indígenas (IBGE, 2000). A imigração de mulheres durante os primeiros séculos de colonização foi quase insignificante, sendo a quase totalidade do fluxo migratório representada por homens (em torno de 500.000 homens entre 1500 e 1808), a maioria portugueses. Da metade do século XVI até 1855, 4 milhões de escravos africanos foram enviados ao Brasil. Em 1808, a vinda da família real portuguesa para o Brasil abriu as portas para a chegada de imigrantes de todo o mundo. Entre 1820 e 1975, 5.686.133 imigrantes, a maioria europeus, chegaram ao Brasil, sendo que portugueses e italianos compreendem 70% do total. Desta forma, os primeiros brasileiros nasceram do cruzamento de homens europeus com índias americanas. De

fato, hoje se sabe que a vasta maioria dos cromossomos Y da população brasileira possui no seu DNA marcadores moleculares de origem européia (Silva et al, 2001).

Do exposto acima, vê-se que a população brasileira está entre as mais heterogêneas do mundo, como resultado de cinco séculos de cruzamento entre povos de três continentes: os colonizadores europeus, principalmente caracterizados pelos portugueses, os escravos africanos e os ameríndios, corroborando para a hipótese de antropologistas e geneticistas humanos de que, sob o ponto de vista biológico, as raças humanas não existem (Silva et al, 2001; Parra et al, 2003). Parra e colaboradores estudaram uma amostra de 200 homens de quatro diferentes regiões do Brasil (norte, nordeste, sudeste e sul), demonstrando concordância com estes dados históricos, através da análise do DNA mitocondrial: há predominância de linhagem materna ameríndia no norte, africana no nordeste, mista no sudeste e européia no sul. Em diferentes regiões geográficas, o percentual de contribuição africana e ameríndia para a formação populacional varia de 4 a 34% e 0 a 27%, respectivamente (Parra et al, 2003). No Rio Grande do Sul, Dornelles e colaboradores estimaram a contribuição ancestral na formação populacional deste estado em 82% européia, 7% africana e 11% ameríndia (Dornelles et al, 1999).

#### **2.4 História da colonização Italiana no Rio Grande do Sul**

Entre 1815 e 1914, a população européia, que durante séculos mantivera baixas taxas de crescimento demográfico, passou de 180 para 450 milhões de habitantes, crescimento este atribuído não somente aos avanços na medicina, mas também pelo abalo político-social provocado pela introdução do sistema capitalista de produção, com a conseqüente liquidação do feudalismo. Neste período, cerca de 40 milhões de pessoas deixaram seus lares, optando pela vida em outros continentes, sendo que 85% rumou para as Américas (De Boni, 1984a).

Na Itália, a emigração encontra-se ligada ao fato político da unificação, ocorrida em 1870. Os efeitos da introdução do capitalismo fizeram-se sentir primeiramente no norte, onde teve início a grande emigração do século passado. O Piemonte, a Lombardia e depois o Vêneto foram os principais responsáveis por este processo em um primeiro período. A maioria dos que rumaram para outros países eram agricultores, colocados à

margem do processo de produção pela liquidação das estruturas feudais em que se encontravam inseridos na Itália (De Boni, 1984a).

Com relação à proveniência, a zona de colonização italiana do Rio Grande do Sul teve como colonizadores, quase que de modo exclusivo, indivíduos provenientes do norte da Itália que, como dito anteriormente, foi a região mais atingida pela crise econômica no momento da unificação. A emigração de indivíduos do sul da Itália foi posterior à vinda de indivíduos do norte, sendo quase nula a presença de italianos do sul na zona gaúcha de colonização. O Vêneto contribuiu com um maior contingente de emigrantes, provenientes, sobretudo, das províncias de características mistas de Vicenza, Treviso e Verona e da província montanhosa de Beluno. Da Lombardia vieram menores contingentes de emigrantes, devido à sua proximidade com Milão, grande captadora de mão-de-obra para a indústria na época. Cremona, Mântua e parte da Bréscia, próximas do Vêneto forneceram grandes contingentes emigratórios, bem como Bérgamo, província ao sopé dos Alpes. O Piemonte, principal responsável pela unificação italiana, quase não é representado. A região do Trentino-Alto Ágide, anexada à Itália após a I Guerra Mundial, tem inúmeros imigrantes provenientes das províncias de Trento, lingüística e culturalmente italiana (De Boni, 1984b).

De Friole-Venécia Julia vieram imigrantes principalmente das montanhas próximas ao Vêneto. Das demais regiões italianas, mesmo do norte, é pouco significativo o número de imigrantes entrados na zona de colonização italiana do Rio Grande do Sul. O Vêneto foi, pois, o epicentro da corrente imigratória italiana para as terras gaúchas. Apesar da não adoção de critérios de distribuição de terras segundo a proveniência, há predominância de determinados grupos em certas localidades, além de se encontrarem regiões onde a totalidade dos habitantes partiu da mesma província (De Boni, 1984b).

Apesar da região das antigas colônias, na encosta da serra serem mais conhecidas dentro e fora do país, existem outras localidades como Maciel (próximo a Pelotas), Vila Nova (junto a Porto Alegre), Rio Branco (no município de Cruz Alta) onde também houve colônias italianas. Da mesma forma, sabe-se que a imigração urbana de italianos no Rio Grande do Sul representou cerca de 15% do total, constituída de indivíduos de várias proveniências, com forte sabor sulista. Porto Alegre é um caso típico: a colônia de Vila Nova surgiu com agricultores do norte da Itália, mas na zona urbana foi marcante a presença do grupo de Morano Calabro, província de Cosenza e de outros grupos de proveniência urbana. Hoje, os italianos constituem uma das múltiplas etnias a compor o variado espectro de culturas do Rio Grande do Sul (De Boni, 1991).

## 2.5 Estratégias no tratamento da Beta Talassemia

A experiência adquirida nos últimos trinta anos demonstra que a talassemia major, considerada até então doença deformante, incapacitante e obrigatoriamente fatal nos primeiros anos de vida, pode ser tratada, melhorando a qualidade e a expectativa de vida dos afetados, que pode chegar até os 50-60 anos de idade nos países desenvolvidos (Aydinok et al, 2005; Karnon et al, 1999).

O tratamento usualmente disponível para a forma major está baseado principalmente na terapia transfusional, terapia quelante intensiva e esplenectomia (Cançado, 1997; Eleftheriou, 2003). Estratégias no sentido de aumentar a síntese de cadeias de gama globina e assim diminuir o excesso de cadeias alfa não pareadas (grandemente responsáveis pela fisiopatologia da doença) têm sido estabelecidas, através do uso de inibidores da ribonucleotídeo redutase (hidroxiuréia), inibidores da metiltransferase (5-azacitidina), inibidores da histona diacetilase (ácidos graxos de cadeia curta como os butiratos) e eritropoetina. Entretanto, o uso de alguns destes medicamentos ainda não foi aprovado para o uso clínico (Schrier e Angelucci, 2005). Os ensaios clínicos realizados utilizando estes agentes não demonstram os mesmos resultados para todos os pacientes testados, devido à heterogeneidade do gene da beta globina nestes pacientes e à complexidade dos fatores genéticos envolvidos na síntese de Hb F em cada caso, como por exemplo a presença em homozigose do polimorfismo Xmn1, associado com o aumento da expressão do gene da gama globina (Alebouyeh et al, 2004).

Para os casos de anemia grave, a transfusão sangüínea é indicada sempre que os níveis de hemoglobina encontram-se abaixo de 7 g/dL e é essencial para a prevenção de insuficiência cardíaca, maior causa de morte nestes pacientes. A prática usual é a manutenção do regime transfusional a cada três semanas, para a estabilização dos níveis de hemoglobina entre 9 e 12 g/dL. Entretanto, cada unidade de hemácias transfundidas contém entre 200-250 mg de ferro. Desta forma, pacientes dependentes de transfusões sangüíneas regulares necessitam de terapia coadjuvante com agentes quelantes do ferro, como a deferoxamina, deferiprona e o ICL670, este último em fase de testes (Cohen, 2004). Estas substâncias removem o ferro ligado ou não à transferrina, extracelularmente no caso da deferoxamina e intracelularmente no caso da deferiprona. Em ambos os

casos, o ferro quelado é excretado pela urina (Schrier e Angelucci, 2005). Um estudo realizado por Taher e colaboradores, que acompanharam durante 24 meses um grupo 57 pacientes com talassemia major dependente de transfusões, em uso de deferiprona ou deferoxamina, demonstrou que, com base nos níveis de ferritina, a deferiprona apresenta eficácia equivalente à deferoxamina e está relacionada a um maior índice de aceitação por parte dos pacientes, pelo fato de ser administrada por via oral, em detrimento da deferoxamina, administrada através do uso de bombas de infusão (Taher et al, 2001).

Além das complicações cardíacas, decorrentes principalmente da anemia crônica, sobrecarga de ferro, miosite, cardiomiopatia e hipertensão pulmonar, os indivíduos que apresentam as formas graves de talassemia são também acometidos pela osteopenia e osteoporose, endocrinopatias, hipogonadismo, hipoparatiroidismo, hipotireoidismo e retardo no crescimento, hipercoagulabilidade, trombofilia e toda gama de problemas psicossociais associados a uma doença genética de certo modo incapacitante como a beta talassemia major (Schrier e Angelucci, 2005; Voskaridou, 2004). É sabido que aqueles pacientes que têm maior adesão ao tratamento são os que possuem maior conhecimento da sua doença como um todo, o que leva ao desenvolvimento de distúrbios comportamentais como ansiedade, depressão, agressividade e internalização, tanto por parte do indivíduo afetado como de sua família. Assim, o acompanhamento psicológico nestes grupos deve objetivar não somente a melhor aceitação ao tratamento, mas também a prevenção de doenças psiquiátricas para estes indivíduos e suas famílias (Aydinok et al, 2005).

Hoje, a indústria farmacêutica busca desenvolver novos fármacos quelantes do ferro oralmente ativos, com as mesmas características de efetividade da deferoxamina. Protocolos de tratamento baseados na terapia quelante combinada (um fármaco administrado via bomba de infusão e outro oralmente) têm sido utilizados com boas vantagens, como o aumento da eficácia, diminuição da toxicidade, prevenção do acúmulo de ferro não ligado à transferrina, acessibilidade a diferentes depósitos de ferro, pelo uso de quelantes com propriedades químicas distintas, além da melhora na adesão ao tratamento (Cohen, 2004). A tabela 7 mostra o atual estado da arte na pesquisa de alguns agentes quelantes do ferro.

**Tabela 7** - Status de desenvolvimento de novos agentes quelantes do ferro. Adaptado de Cohen, 2004.

Agente quelante	Status
Deferiprona	aprovada em mais de 50 países
ICL 670	ensaios de fase III em andamento
GT56-252	ensaios de fase I concluídos
40SD02	ensaios de fase I concluídos
HBED (ácido hidroxibenzil-etilenodiamino-diacético)	projeto para ensaio de fase I concluído
PIH (piridoxal isonicotinoil hidrazona)	estudos pré-clínicos

Atualmente, o único tratamento curativo disponível para beta talassemia major é o transplante alogênico de medula óssea, com uma probabilidade de sobrevida livre de talassemia de 68%. O grupo de Pesaro, na Itália, pioneiro na utilização do transplante de medula óssea do tratamento da talassemia major, observou que em um número significativo de pacientes a doença pode ser controlada através do transplante parcial ou quimerismo misto, isto é, com a presença simultânea de células originais da medula óssea do receptor e células do doador. Apesar do quimerismo ser um fator de risco para a recorrência de talassemia, um percentual de apenas 20% de células do doador na medula transplantada é capaz de manter valores normais de hemoglobina, permitindo ao paciente sobreviver livre da necessidade de transfusões sanguíneas (Cohen, 2004).

## 2.6 Importância do Diagnóstico

Em indivíduos portadores de doença talassêmica beta monogênica, o diagnóstico genético faz-se necessário, pois estes apresentam um gene defeituoso e a propensão de desenvolver a doença, além do risco de ser afetado ou de gerar filhos afetados. Este diagnóstico oferece um resultado permanente e definitivo para o indivíduo. Também pode trazer implicações para outros membros da família e para a descendência, devendo estar vinculado ao aconselhamento genético.

O diagnóstico pré-natal de uma doença genética possibilita a um casal de risco garantir se o feto que está sendo gerado é afetado ou não por essa doença genética, e



tem sido um método acurado para a pesquisa de talassemia major em países com prevalência aumentada e política de saúde que permitam intervenção (Liu et al, 1997).

Os programas de triagem neonatal visam detectar precocemente indivíduos portadores de talassemia e conseqüentemente, fornecer o tratamento adequado.

Em programas de diagnóstico pré-natal, pesquisa neonatal ou triagem populacional é importante o aconselhamento genético, com apoio psicológico diante do diagnóstico adequado, fornecendo ao indivíduo a possibilidade de decidir conscientemente sobre sua prole (Ramalho, 1986).

### **3. OBJETIVOS**

Devido a mutações específicas de determinados grupos étnicos e à grande diversidade genética da população brasileira, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar as mutações que originam as talassemias do tipo beta em uma amostra da população do Rio Grande do Sul.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu MMS, Penalver JA. Incidence of beta-thalassemia carriers and those deficient in erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase in the greater Buenos Aires area. *Sangre* 1983; 28(5):537-41.

Adekile AD, Gu LH, Baysal E, Haider MZ, al-Fuzae L, Aboobacker KC et al. Molecular characterization of alpha-thalassemia determinants, beta-thalassemia alleles, and beta S haplotypes among Kuwaiti Arabs. *Acta Haematol.* 1994; 92(4):176-81.

Alebouyeh M, Moussavi F, Haddad-Deylami H, Vossough, P. Hydroxyurea in the treatment of major beta-thalassemia and importance of genetic screening. *Ann. Hematol.* 2004 Jul; 83(7):430-3.

Angastiniotis M, Modell B. Global Epidemiology of Hemoglobin Disorders. Cooley's Anemia Seventh Symposium. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Published by the New York Academy of Sciences Any AA9850. Editor Alan R. Cohen. 1998 Jun 30; 850:251-69.

Araujo AS, Silva WA, Leao SA, Bandeira FC, Petrou M, Modell B, Zago, MA. A different molecular patterns of beta-thalassemia mutation in northeast Brazil. *Hemoglobin* 2003 Nov; 27(4):211-7

Aydinok Y, Erermis S, Bukusoglu N, Yilmaz D, Solak U. Psychosocial implications of Thalassemia Major. *Pediatr Int*, 2005 Feb; 47(1):84-9.

Baysal E, Indrak K, Bozkurt G, Berkalp A, Aritkan E, Old JM et al. The beta-thalassaemia mutations in the population of Cyprus. *Br. J. Haematol.* 1992 Aug; 81(4):607-9.

Bertuzzo CS, Sonati MF, Costa FF. Hematological phenotype and the type of  $\beta$ -thalassemia mutation in Brazil. *Braz. J. Genet.* 1997 Jun; 20(2):319-321.

Beutler E. Discrepancies between genotype and phenotype in hematology: an important frontier. *Blood* 2001 Nov 1; 98(9):2597-602.

Bianco I, Cappabianca MP, Foglietta E, Lerone M, Deidda G, Morlupi L, Grisanti P, Ponzini D, Rinaldi S, Graziani B. Silent thalasseмии: genotypes and phenotypes. *Haematologica* 1997 May-Jun; 82(3):269-80.

Bragós IM, Noguera NI, Morisoli L, Milani AC. Most frequent mutations of beta-thalassaemia in Rosario, Argentina. *Haematologica* 2000 Jan; 85(1):101-2.

Bungert J, Tanimoto K, Patel S, Liu Q, Fear M, Engel JD. Hypersensitive site 2 specifies a unique function within the human beta-globin locus control region to stimulate globin gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 1999 Apr; 19(4):3062-72.

Cançado, R. D. Talassemias: Manifestações Clínicas e Tratamento. In: NAOUM, P.C. (eds.). *Hemoglobinopatias e Talassemias*. São Paulo: Sarvier, 1997, p.121-137.

Cao A, Rosatelli C, Pirastu M, Galanello R. Thalasseмии in Sardinia: molecular pathology, phenotype-genotype correlation, and prevention. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991 Summer; 13(2):179-88.

Cao A, Rosatelli MC, Monni G, Galanello R. Screening for thalassaemia: a model of success. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am* 2002 Jun; 29(2):305-28, vi-vii.

Chakrabarti P, Gupta R, Mishra A, Rai M, Singh VP, Dash D. Spectrum of beta-thalassaemia mutations in North Indian states: a beta-thalassaemia trait with two mutations in cis. *Clin. Biochem.* 2005 Jun; 38(6):576-8.

Chouk I, Daoud BB, Mellouli F, Bejaouli F, Gerard N, Dellagi K, Abbas S. Contribution to the description of the beta-thalassaemia spectrum in Tunisia and the origin of mutation diversity. *Hemoglobin*, 2004 Aug; 28(3):189-95.

Cohen AR, Galanello R, Pennell DJ, Cunningham MJ, Vichinsky E. Thalassaemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology. Education Program, p. 14-34, 2004.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. Resolução nº 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. *Bioética*, v.4, p.15-25, 1996.

De Boni LA, Costa R. A Itália de 1870. In: De Boni LA, Costa R. *Os Italianos do Rio Grande do Sul*. 3ed. Caxias do Sul: Correio Riograndense, 1984a, p.49-62.

De Boni LA, Costa R. Os Italianos do Rio Grande do Sul. In: De Boni LA, Costa R. *Os Italianos do Rio Grande do Sul*. 3ed. Caxias do Sul: Correio Riograndense, 1984b, p.78-92.

De Boni LA, Costa R. Italiano urbano: comerciantes, prestadores de serviços, operários. In: De Boni, L. A.; Costa, R. *Far la Mérica*. Porto Alegre, Riocell, 1991, v.3, p.78-88

Dornelles CL, Jacques SMC, Robinson WM, Weimer TA, Franco MHL, Hickmann AC, Geiger CJ, Salzano FM. Genetics, surnames, grandparents' nationalities, and ethnic admixture in Southern Brazil: Do the patterns of variation coincide? *Genet. Mol. Biol.* 1999 Jun; 22(2):151-161.

Eleftheriou A. Genetics and Thalassemia. In: Eleftheriou A. *About Thalassaemia*. Cyprus. Thalassaemia Internacional Federation Publications, 2003, p. 9-21.

El-Hazmi MA, Al-Swailem AR, Warsy AS. Molecular defects in beta-thalassaemias in the population of Saudi Arabia. *Hum. Her.* 1995 Sep-Oct; 45(5):278-85.

Fattoum S, Messaoud T, Bibi A. Molecular basis of beta-thalassaemia in the population of Tunisia. *Hemoglobin* 2004 Aug; 28(3):177-87.

Faustino P, Pacheco P, Loureiro P, Nogueira PJ, Lavinha J. The geographic pattern of beta-thalassaemia mutations in the portuguese population. *Br. J. Haematol.* 1999 Dec; 107(4):903-4.

Filon D, Oron V, Krichevski S, Shaag A, Shaag Y, Warren TC et al. Diversity of beta-globin mutations in Israeli ethnic groups reflects recent historic events. *Am. J. Hum. Genet.* 1994 May; 54(5):836-43.

Filon D, Oron V, Shawa R, Elborno E, Najjar K, Tulchinsky T et al. Spectrum of beta-thalassemia mutations in the Gaza area. Hum. Mutat. 1995; 5(4):351-3.

Flatz G, Wilke K, Syagailo YV, Eigel A, Horst J. Beta-thalassemia in the German population: mediterranean, Asian and novel mutations. Hum. Mutat. 1999; 13(3):258.

Freitas EM, Rocha FJ. Detection of beta-thalassemia heterozygotes among caucasians from Porto Alegre, RS, Brazil. Rev. Bras. Genét 1983; 6(1):185-188.

Georgiou I, Makis A, Chaidos A, Bouba I, Hatzi E, Kranas V, Zilidis C, Bourantas KL. Distribution and frequency of beta-thalassemia mutations in northwestern and central Greece. Eur. J. Haematol. 2003 Feb; 70(2):75-8.

<http://globin.cse.psu.edu/html/huisman/thals/tables/table02.html>. Acessado em 10/10/2006.

Guidelines for the Clinical Management of Thalassaemia. Thalassaemia International Federation, 2000. pp.114.

Harju S, McQueen KJ, Peterson KR. Chromatin Structure and Control of  $\beta$ -Like Globin Gene Switching. Exp. Biol. Med. 2002 Oct; 227(9):683-700.

Higgs DR. Gene regulation in hematopoiesis: new lessons from thalassemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2004;:1-13.

Huisman THJ, Carver MFH & Bysal E (1997). A Syllabus of Thalassemia Mutations. The Sickle Cell Anemia Foundation, Augusta, USA.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2000) Brasil: 500 anos de povoamento. IBGE, Rio de Janeiro.

Ikuta T, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Kan YW. Globin gene switching. In vivo protein-DNA interactions of the human beta-globin locus in erythroid cells expressing the fetal or the adult globin gene program. *J. Biol. Chem.* 1996 Jun 14; 271(24):14082-91.

Karnon J, Zeuner D, Brown J, Ades AE, Wonke B, Modell B. Lifetime treatment costs of  $\beta$ -Thalassemia major. *Clin Lab Haematol.* 1999 Dec; 21(6):377-85.

Kattamis C, Hu H, Cheg G, Reese AL, Gonzalez RJM, Kutlar A, Kutlar F, Huisman TH. Molecular characterization of beta-thalassaemia in 174 Greek patients with thalassaemia major. *Br. J. Haematol.* 1990 Mar; 74(3):342-6.

Kazazian Jr HH. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin. Hematol.* 1990 Jul; 27(3):209-28.

Khan SN, Riazuddin S. Molecular characterization of beta-thalassemia in Pakistan. *Hemoglobin*, 1998 Jul; 22(4):333-45.

Kyriacou K, Al Quobaili F, Pavlou E, Christopoulos G, Ioannou P, Kleanthous M. Molecular characterization of beta-thalassemia in Syria. *Hemoglobin*, 2000 Feb; 24(1):1-13.

Ko TM, Xu X. Molecular study and prenatal diagnosis of alpha- and beta thalassemias in Chinese. *J. Formos. Med. Assoc.* 1998a Jan; 97(1):5-15.

Ko TM, Caviles AP JR, Hwa HL, Liu CW, Hsu PM, Chung YP. Prevalence and molecular characterization of beta-thalassemia in Filipinos. *Ann. Hematol.* 1998b Dec; 77(6):257-60.

Laig M, Pape M, Hundrieser J, Flatz G. Mediterranean types of  $\beta$ -thalassemia in the German population. *Hum. Genet.* 1990 Jun; 85(1):135-7.

Lau YL, Chan LC, Chan YY, Ha SY, Yeung CY, Waye JS, Chui DH. Prevalence and genotypes of  $\alpha$  e  $\beta$ -thalassemia carriers in Hong Kong: implications for population screening. *N. Engl. J. Med.* 1997 May 1; 336(18):1298-301.

Liu TC, Lin SF, Yang TY, Lee JP, Chen TP, Chang JG. Prenatal diagnosis of thalassemia in the chinese. *Am. J. Hematol.* 1997 Jun; 55(2):65-8.

Luzzatto L, Notaro R. Haemoglobin's chaperone. *Nature.* 2002 Jun 13; 417(6890):703-5.

Magro S, Santilli E, Mancuso R, Puzzonia P, Consarino C, Morgione S, Galati MC, Fersini G, Madonna G, Brancati C, Vadalà P, Molica S. Spectrum of  $\beta$ -thalassemia Mutations in Calabria: Implications for Prenatal Diagnosis. *Am. J. Hematol.* 1995 Feb; 48(2):128-9.

Makhoul NJ, Wells RS, Kaspar H, Shbaklo H, Taher A, Chakar N, Zalloua PA. Genetic heterogeneity of Beta thalassemia in Lebanon reflects historic and recent population migration. *Ann. Hum. Genet.* 2005 Jan; 69(Pt 1):55-66.

Muniz A, Martinez G, Lavinha J, Pacheco P. Beta-thalassemia in Cubans: novel allele increases the genetic diversity at the HBB locus in the Caribbean. *Am. J. Hematol.* 2000 May; 64(1):7-14.

Naoum PC, Alvarez Filho F, Domingos CRB, Ferrari F, Moreira HW, Sampaio ZA, Maziero PA, Castilho EM. Hemoglobinas anormais no Brasil: prevalência e distribuição geográfica. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*, v. 23, n. 3, p. 68-79, 1987.

Naoum PC. Molécula da Hemoglobina. In: Naoum, P.C. (eds.). *Hemoglobinopatias e Talassemias*. São Paulo: Sarvier, 1997a, p. 16-21.

Naoum, PC. Ontogenia das Hemoglobinas. In: NAOUM, P.C. (eds.). *Hemoglobinopatias e Talassemias*. São Paulo: Sarvier, 1997b, p. 22-24.

Naoum, PC. Distribuição geográfica das hemoglobinopatias. In: Naoum, P.C. (eds.). *Hemoglobinopatias e Talassemias*. São Paulo: Sarvier, 1997c, p. 137-143.

Naoum, PC. As Alterações das Hemoglobinas. In: Naoum, P.C. (eds.). *Hemoglobinopatias e Talassemias*. São Paulo: Sarvier, 1997d, p. 31-35.

Olivieri NF. The  $\beta$ -Thalassemias. *N. Engl. J. Med.* 1999 Jul 8; 341(2):99-109.



Omar A, Abdel KE, Gendy WE, Marzouk I, Wadgy M. Molecular basis of beta-thalassemia in Alexandria. *Egypt J Immunol*, 2005; 12(1):15-24.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in brazilians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003 Jan 7; 100(1):177-82.

Park SS, CHO HI. Beta-thalassemia in the Korean population. *Int. J. Hematol.* 2002a Aug; 76 Suppl 2:93-5.

Park SS, Lee YJ, Kim JY, Joo SI, Hattori Y, Ohba Y, Cho HI. Beta-thalassemia in the Korean population. *Hemoglobin*, 2002b May ;26(2):135-45.

Perella M, Russo, R. Allosteric proteins: lessons to be learned from the hemoglobin intermediates. *News Physiol. Sci.* 2003 Dec; 18:232-6.

Perez SM, Moreno MI, Boluferx GP, Lerma AE, Gomez RMA, Vaya MA, Tascon AA, Dasi CMA, Martinez SM, Lopez EAR, Hernandez ML, Gil AR. Molecular characterization of thalassemias in the Valencia community and its relationship with the hematological phenotype. *Sangre* 1998 Oct; 43(5):392-8.

Ramalho AS. As hemoglobinopatias hereditárias: um problema de saúde pública no Brasil. FCA, São Paulo, p. 46-50, 1986.

Roldan A, Gutierrez M, Cygler A, Bonduel M, Sciuccati G, Torres AF. Molecular Characterization of  $\beta$ -Thalassemia Genes in an Argentine Population. *Am. J. Hematol.* 1997 Mar; 54(3):179-82.

Romana M, Keclard L, Guillemin G, Lavocat E, SAINT-MARTIN C, Berchel C, Merault G. Molecular Characterization of beta-thalassemia mutations in Guadeloupe. *Am. J. Hematol.* 1996 Dec; 53(4):228-33.

Rosatelli MC, Tuveri T, Scalas MT, Leoni GB, Sardu R, Faa V, Meloni A, Pischedda MA, Demurtas M, Monni G et al. Molecular screening and fetal diagnosis of beta-thalassemia in the Italian population. *Hum. Genet.* 1992a Aug; 89(6):585-9.

Rosatelli MC, Dozy A, Faa V, Meloni A, Sardu R, Saba L, Kan YW, Cao A. Molecular characterization of beta-thalassemia in the Sardinian population. *Am. J. Hum. Genet.* 1992b Feb; 50(2):422-6.

Rossetti LC, Targovnik HM, Varela V. The molecular basis of  $\beta$ -thalassemia in Argentina. Influence of the pattern of immigration from the Mediterranean Basin. *Haematologica* 2004 Jun; 89(6):746-7.

Rund D, Filon D, Strauss N, Rachmilewitz EA, Oppenheim A. Mean corpuscular volume of heterozygotes for beta-thalassemia correlates with the severity of mutations. *Blood* 1992 Jan; 79(1):238-43.

Rund D, Rachmilewitz E.  $\beta$ -Thalassemia. *N. Engl. J. Med.* 2005 Sep 15; 353(11):1135-46.

Sadiq MF, Huisman TH. Molecular characterization of beta-thalassemia in north Jordan. *Hemoglobin* 1994 Sep; 18(4-5):325-32.

Salzano FM. Saúde pública no Primeiro e Terceiro Mundos: desafios e perspectivas. *Ciênc. saúde coletiva* 2002; 1(7):7-16.

Schilirò G, Di Gregorio F, Samperi P, Mirabile E, Liang R, Cürük MA, YE Z, Huisman TH. Genetic heterogeneity of  $\beta$ -thalassemia in Southeast Sicily. *Am. J. Hematol.*, 1995 Jan; 48(1):5-11.

Schrier SL, Angelucci E. New strategies in the treatment of the thalassemias. *Annu. Rev. Med.*, 2005; 56:157-71.

Schwarz C, Vetter B, Kohne E, Kulozik AE. Beta thalassemia in Germany: molecular genetics and clinical phenotype in immigrant and in the native population. *Klin Padiatr* 1997 Jul-Aug; 209(4):172-7.

Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD. The Phylogeography of Brazilian Y-Chromosome Lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 2001 Jan; 68(1):281-6.

Steinberg MH, Adams JG 3<sup>rd</sup>. Hemoglobin A2: origin, evolution, and aftermath. *Blood* 1991 nov; 78(9):2165-77.

Steinberg MH, Benz EJ Jr, Adewoye HA, Ebert B. Pathobiology of the Human Erythrocyte and its Hemoglobins. In: *Hematology: Basic Principles and Practices*. Philadelphia:Elsevier, 2005, p. 442.

Taher A, Sheikh-taha M, Koussa S, Inati A, Neeman R, Mourad F. Comparison between deferoxamine and deferiprone (L1) in iron-loaded thalassemia patients. *Eur. J. Haematol.* 2001 Jul; 67(1):30-4.

Talmaci R, Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Coriu D, Colita D, Gavrila L. Scanning of beta-globin gene for identification of beta-thalassemia mutation in Romanian population. *J. Cell. Mol. Med.* 2004 Apr-Jun; 8(2):232-40.

Thanarattanakorn P, Louthrenoo O, Sittipreechacharn S, Sanguansermisri T. Family functioning in children with thalassemia. *Clin Pediatr (Phila)* 2003 Jan-Feb; 42(1):79-82.

Thein SL. Beta-thalassemia prototype of a single disorder with multiple phenotypes. *Int. J. Hematol.*, 2002 Aug; 76 Suppl 2:96-104.

Verma IC, Saxena R, Thomas E, Jain PK. Regional distribution of beta-thalassemia mutations in India. *Hum. Genet.* 1997 Jul; 100(1):109-13.

Vetter B, Schwarz C, Kohne E, Kulozik AE. Beta-thalassemia in the immigrant and non-immigrant German populations. *Br. J. Haematol.* 1997 May; 97(2):266-72.

Vichinsky EP, Macklin EA, Waye JS, Lorey F, Olivieri NF. Changes in the Epidemiology of Thalassemia in North America: A New Minority Disease. *Pediatrics* 2005 Dec; 116(6):818-25.

Villegas A, Ropero P, Gonzalez FA, Anguita E, Espinos D. The thalassemia syndromes: molecular characterization in the Spanish population. *Hemoglobin* 2001 Aug; 25(3):273-83.

Voskaridou E, Terpos E. New insights into the pathophysiology and management of osteoporosis in patients with beta thalassemia. *Br. J. Haematol.* 2004 Oct; 127(2):127-39.

Weatherall DJ, Clegg JB. Structure, function, genetics and biosynthesis of haemoglobin. In: Weatherall, D.J.; Clegg, J.B (eds). *The thalassemia syndromes*. 3 ed. London: Blackwell Scientific Publication, 1981a. p. 19-48.

Weatherall DJ, Clegg JB. Erythropoiesis. Developmental Changes in Haemoglobin and Red Cell Production. In: Weatherall DJ, Clegg JB (eds). *The thalassemia syndromes*. 3 ed. London: Blackwell Scientific Publication, 1981b. p. 49-84.

Weatherall DJ. The molecular basis for phenotypic variability of the common thalassaemias. *Mol Med Today*, 1995 Apr; 1(1):15-20.

Weatherall DJ. The Thalassemias. *BJM.* 1997 Jun 7; 314(7095):1675-8.

Weatherall DJ. Single gene disorders or complex traits: lessons from the thalassaemias and other monogenic diseases. *BMJ.* 2000; 321:1117-1120.

Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull. World Health Organ.*, 2001; 79(8):704-712.

Weatherall DJ. The global problem of genetic disease. *Ann. Hum. Biol.*, 2005; 32(2):117-122.

Zago MA, Costa FF, Tone LG, Bottura C. Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population. *Hum. Hered*, 1983; 33:125-9.

Zdebska E, Krawcewicz A, Adamowicz AS, Jackowska T, Tejza B, Strojny W, Kuliszkiewicz JM, Mokras U, Koscielak J. Beta-Thalassemia in Poland. Mediterranean mutations in beta-thalassemia. *Pol Merkuriusz Lek* 2006 Jan;20(115):53-6.

Zeng Y, Huang S. The studies of hemoglobinopathies and thalassemia in China – the experiences in Shanghai Institute of Medical Genetics. *Clin. Chim. Acta* 2001 Nov; 313(1-2):107-11.

## **Identificação de Mutações para Beta Talassemia em uma População do Extremo Sul do Brasil\*.**

\* a ser submetido para a revista Annals of Hematology e já redigido conforme suas normas

Vivian C.D. Reichert. Simone M. de Castro. Sandrine C. Wagner. Dulcinéia M. de Albuquerque. Mara H. Hutz. Sandra Leistner-Segal

Autor para correspondência:

Vivian Caroline Dadalt Reichert

João Pessoa, 339/104 B

Porto Alegre CEP 90040-000

Tel: 55 51 3028 0646

E-mail: [vdadalt@terra.com.br](mailto:vdadalt@terra.com.br)

Palavras-chave: hemoglobina, talassemias, genótipos, Brazil, sequenciamento gênico, HPLC.

---

Vivian C.D. Reichert (✉). Sandra L. Segal. Serviço de Genética Médica – Laboratório de Genética Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS, CEP 90035-003, Brasil - Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2400, Porto Alegre, RS, CEP 90035-003, Brasil

Simone M. de Castro. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Sandrine C.Wagner. Centro Universitário FEEVALE, Novo Hamburgo, RS, Brasil

Mara H. Hutz. Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Dulcinéia M. de Albuquerque. Hemocentro, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil

Fontes de Financiamento: FIPE / Hospital de Clínicas de Porto Alegre

## Resumo

Este estudo avaliou o perfil genotípico em uma amostra de 127 indivíduos beta talassêmicos não relacionados, diagnosticados através da quantificação de hemoglobina A<sub>2</sub> por HPLC e oriundos de um estado brasileiro localizado mais no extremo sul, localidade onde houve um grande fluxo de imigrantes italianos no final do século XIX, principalmente provindos do norte da Itália e alguns indivíduos do sul. A análise molecular foi realizada por seqüenciamento das regiões gênicas que contêm as mutações para beta talassemia mais comumente encontradas na região do mediterrâneo. A mutação sem sentido do códon 39 C>T foi a mais freqüente (50,9%), seguida pela IVSI-110 G>A (18,1%), IVSI-1 G>A (12,9%), IVSI-6 T>C (9,5%) e outras mutações (8,6%). A região gênica de escolha para análise molecular foi capaz de identificar 90,6% das mutações para beta talassemia na amostra estudada, demonstrando similaridade com os dados de freqüência alélica dos principais países colonizadores do Estado do Rio Grande do Sul. A comparação com dados disponíveis para outros estados brasileiros mostrou-se marcadamente significativa, de onde se vê que o perfil genotípico dos pacientes beta talassêmicos no Brasil apresenta grande variabilidade. Portanto, seria arbitrário inferir como representativos da população brasileira dados oriundos de amostragens regionais. É necessário que outros estados brasileiros estudem seus genótipos, tornando possível o melhor entendimento da doença e o estabelecimento de políticas de saúde adequadas.

As beta talassemias constituem um grupo heterogêneo de distúrbios genéticos da síntese de hemoglobina com origem na região do Mediterrâneo, espalhando-se pelo sul da China, sudeste da Ásia, subcontinente indiano, Malásia, Indonésia e para grupos de população negra [36, 7].

Mais de 200 diferentes mutações no gene da beta globina podem ocasionar beta talassemia, com ausência (talassemia  $\beta^0$ ) ou redução (talassemia  $\beta^+$ ) das cadeias de beta globina [36, 26, 15, 45]. Em revisão da literatura, Huisman e colaboradores identificaram e classificaram os alelos mutantes mais freqüentes para beta talassemia, demonstrando que 20 mutações são responsáveis por cerca de 80% dos casos desta alteração [16]. Clinicamente, as beta talassemias são doenças heterogêneas em função da ampla variedade de lesões gênicas que ocasionam o desequilíbrio na síntese de cadeias globínicas, ou seja, apenas a lesão em um locus específico não é suficiente para explicar a variabilidade fenotípica de indivíduos com o mesmo genótipo, sugerindo a existência de outros moduladores genéticos que possam explicar este fato [4]. Apesar desta condição genética ocorrer com maior freqüência nas regiões tropicais, os movimentos populacionais migratórios favoreceram a sua disseminação para outras áreas, encontrando-se hoje indivíduos portadores do gene para talassemias e outras desordens das hemoglobinas na Europa, Américas e Austrália [45, 1]. Estudos moleculares já identificaram variações no gene da beta globina em diferentes populações [19, 44, 5, 6, 34, 35, 47, 12, 20, 49, 8, 27, 28,33, 25, 32, 3, 2, 18, 22, 10, 9, 11].

A população brasileira está entre as mais heterogêneas do mundo, como resultado de cinco séculos de cruzamento entre povos de três continentes: os colonizadores europeus, principalmente caracterizados pelos portugueses, os escravos africanos e os ameríndios [40, 29]. Desta forma, dentro de um país de dimensões continentais como o Brasil, a composição étnica da população apresenta ampla variabilidade entre as diferentes regiões, mas na região sul ocorre uma diferenciação em relação a este padrão, como já demonstrado através de estudos que avaliaram o grau de miscigenação nesta população, constituída principalmente por descendentes de portugueses, apesar de italianos, espanhóis e alemães também terem contribuído para a formação do pool gênico nesta região brasileira. Um estudo sobre mistura étnica em brasileiros e outros povos latino americanos foi recentemente publicado por Salzano e Bortolini (2002), que demonstraram uma boa correlação entre a classificação morfológica baseada na cor da pele e traços fenotípicos e a estimativa genética de mistura [38]. Através da análise de



marcadores genéticos indicativos de ancestralidade, Zembruski e colaboradores demonstraram que o grau de mistura africana na população classificada como branca no Rio Grande do Sul é de 6% [48].

No sul do Brasil, houve um grande fluxo de imigrantes italianos no final do século XIX, principalmente provindos do norte da Itália e alguns indivíduos do sul [13]. Com base neste fato, objetivou-se aqui determinar o perfil genotípico em uma amostra de indivíduos beta talassêmicos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa das Instituições participantes e todos os indivíduos incluídos na amostra estudada tiveram sua participação autorizada através da assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A amostra estudada incluiu 127 indivíduos (sendo 89 do sexo feminino e 36 do sexo masculino, com uma mediana de idade em 37 anos), dos quais 124 foram classificados como portadores de traço beta talassêmico com base na quantificação da Hb A<sub>2</sub>, 1 homocigoto e 2 com beta talassemia associada com a presença de hemoglobina S (Hb S), totalizando 128 cromossomos analisados. Em todos os casos, os pacientes eram oriundos do Estado do Rio Grande do Sul, localizado no extremo sul do Brasil, e foram atendidos no Laboratório Weinmann, empresa de caráter privado, e no Laboratório de Hemoglobinas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de março de 2003 a dezembro de 2004. Os casos incluídos neste estudo tiveram diagnóstico prévio compatível com a possível presença de um alelo beta talassêmico, através da quantificação das hemoglobinas A<sub>2</sub> (Hb A<sub>2</sub>) e fetal (Hb F) por procedimentos eletroforéticos e/ou cromatográficos [31].

As amostras de sangue foram colhidas em tubos a vácuo, com EDTA como anticoagulante. Os índices hematimétricos, da mesma forma que a contagem de reticulócitos e suas populações de fluorescência, foram obtidos através do contador eletrônico de células Sysmex SE9500 (Sysmex Corporation, Kobe, Japão), equipamento que tem como base metodológica a citometria de fluxo para a determinação dos índices supracitados e a coloração direta do conteúdo de RNA, no caso dos reticulócitos. As hemoglobinas A<sub>2</sub> e fetal foram quantificadas por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC-VARIANT, Bio-Rad, Milão, Itália).

O DNA genômico foi extraído das amostras de sangue periférico através do método de precipitação por sais [23] e amplificado através da reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR), como descrito anteriormente [24], utilizando

os primers P1 e P5, localizados respectivamente nas posições -161 até -147 da região promotora e na posição 115 até 95 do íntron 2 do gene da beta globina, o que gera um fragmento de 771 pb, e os primers 58 e P7, localizados respectivamente nas posições 738 até 756 do íntron 2 e 1562 até 1542 da região 3' UTR do referido gene, o que gera um fragmento de 430 pb. Após purificação, os produtos de PCR foram submetidos à reação de seqüenciamento de DNA, utilizando primers internos, de forma a contemplar as regiões gênicas onde estão localizadas as mutações mais comumente encontradas para beta talassemia nas populações de origem mediterrânea [6, 34, 35, 21,39], de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye *Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amersham Pharmacia Biotech, Inc Cleveland, Ohio, Estados Unidos).

Com relação à análise estatística, os resultados obtidos foram analisados através de estatísticas descritivas utilizando a distribuição de freqüências, teste *t* e teste de Mann-Whitney para a comparação de médias e medianas entre os índices hematimétricos dos grupos com mutações do tipo  $\beta^+$  e  $\beta^0$  e, para os heterozigotos, a comparação entre as médias dos índices obtidos para as diferentes mutações foi realizada através da análise de variância e teste de Tukey para comparações múltiplas. A comparação entre as freqüências alélicas observadas em diferentes regiões brasileiras foi realizada através do teste qui-quadrado. Para todas as análises acima citadas, utilizou-se o *Statistical Package for Social Science* (SPSS, versão 12.0, Chicago, Illinois).

Entre março de 2003 e dezembro de 2004, foram analisados um total de 127 indivíduos. A Tabela 1 mostra os alelos encontrados na casuística analisada e sua repercussão em nível fenotípico. Dos 128 cromossomos estudados, foi possível identificar a mutação beta talassêmica em 116 casos, sendo 34 compatíveis com fenótipo do tipo  $\beta^+$  e 82 com fenótipo  $\beta^0$ . A tabela 2 mostra a distribuição dos alelos encontrados entre os indivíduos beta talassêmicos obtida neste estudo, juntamente com as freqüências observadas nos principais países colonizadores do Rio Grande do Sul e também em outras regiões brasileiras.

A metodologia empregada foi desenhada com o objetivo de detectar as mutações para beta talassemia encontradas com maior freqüência na região do Mediterrâneo. A mutação sem sentido do códon 39 C>T foi a mais freqüente (50,9%), seguida, em ordem decrescente, pela IVSI-110 G>A (18,1%), IVSI-1 G>A (12,9%), IVSI-6 T>C (9,5%) e outras mutações (8,6%), a saber: 3 casos com CD15 STOP códon (TGG>TGA), 2 casos com mutação na posição +20 da região promotora, 1 caso da mutação IVSII-850 (-G), 1

caso da IVSI-5 (G>A), 1 da IVSI(-1) ou cd 30 (AGG>ACG) e 1 caso de mutação na posição -29 da região promotora).

A seqüência gênica analisada foi capaz de identificar 90,6% das mutações para beta talassemia na amostra estudada. Em 12 casos (9,4%), não foram encontradas mutações para a região analisada.

Fenotipicamente, dos 116 cromossomos estudados nos quais a mutação beta talassêmica foi identificada, encontrou-se 34 casos com mutações de fenótipo  $\beta^+$  e 82 com fenótipo  $\beta^\circ$ . Para as mutações de fenótipo  $\beta^+$ , a mutação IVSI-110 G>A ocorreu com maior freqüência na amostra estudada (21 dos 34 casos válidos, ou 61,8%) e para o fenótipo  $\beta^\circ$  a mutação do códon 39 C>T foi a mais freqüente (59 casos entre os 82 válidos, 71,9%).

Através da análise de variância, foi estabelecida diferença significativa a 5% de nível de significância entre os índices VCM e HCM para heterozigotos portadores das mutações estudadas. A análise por comparações múltiplas mostrou que esta diferença se deu entre o grupo portador das mutações Códon 39 C>T e IVSI 110 G>A (P=0,017 para VCM e P=0,014 para HCM) e Códon 39 C>T e IVSI 6 T>C (P= 0,009 para VCM e P<0,001 para HCM) (tabela 3).

A comparação das médias pelo agrupamento dos casos em dois grupos fenotípicos ( $\beta^\circ$  e  $\beta^+$ ) mostrou diferença significativa entre grupos para hemoglobina (P=0,022), VCM (P=0,002), HCM (P<0,001) CHCM (P=0,030), percentual de reticulócitos (P=0,028) e Hb A<sub>2</sub> (P<0,001), conforme se pode observar na tabela 4.

As informações relativas à epidemiologia das beta talassemias é de difícil obtenção, pois existem diferenças na freqüência de portadores até mesmo dentro de um mesmo país. Na Itália, por exemplo, a freqüência dos portadores varia de 1-2% no norte e chega a 12% nas regiões da Sardenha e Ferrara, ficando a média em torno de 5%. Além disto, há a co-existência de vários grupos étnicos em alguns países, onde a doença foi trazida pelos imigrantes, como no norte da Europa e Estados Unidos. Em Oman, onde houve a migração da tribo Beluschi, vinda da região do Irã e Paquistão, existem altos percentuais de portadores (10%) em relação à população indígena árabe (1-2%). É primordial aqui salientar a importância do mapeamento da freqüência de portadores, dado de maior importância para a detecção de grupos de risco e o estabelecimento de programas de aconselhamento adequados [1].

Sendo assim, não são disponíveis dados epidemiológicos precisos para todos os países do mundo e outros poucos foram totalmente mapeados, com suas diferenças

regionais identificadas. Apesar de existirem vários estudos no campo das hemoglobinopatias no Brasil, a real incidência de beta talassemias no país não é completamente conhecida, o que se pode atribuir às pronunciadas diferenças regionais em relação à etnia [46].

O presente estudo analisou o espectro de mutações para beta talassemia em uma amostra de indivíduos oriundos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, ainda não investigados em nível molecular para esta doença. Devido à característica imigratória do sul do Brasil, colonizado basicamente por europeus que aqui chegaram no início do século XIX, as regiões gênicas de escolha para o seqüenciamento de DNA foram aquelas que continham as mutações mais comumente encontradas nos países mediterrâneos. Com efeito, as mutações CD39 C>T, IVSI 110 G>A, IVSI 6 T>C e IVSI 1 G>A contemplam 91,4% dos casos com as mutações para beta talassemias esclarecidas na amostra estudada. A comparação dos resultados obtidos neste estudo com as freqüências alélicas encontradas em populações da região do Mediterrâneo e/ou países colonizadores do Estado do Rio Grande do Sul mostram certa similaridade.

Com relação à comparação do tipo de mutação identificada com os índices hematimétricos obtidos, estes foram consistentes com a literatura para as diferentes mutações encontradas e também agrupando-as pelos fenótipos  $\beta^+$  e  $\beta^0$ , apesar de fatores de confusão que também têm influência nestes índices, como a co-herança com talassemias do tipo alfa, não terem sido controlados [37]. Da mesma forma, a presença concomitante de anemia por deficiência de ferro também tem influência direta sobre os índices supracitados. Entretanto, a forma de delineamento do estudo, no qual os indivíduos foram selecionados para inclusão a partir de níveis de Hb A<sub>2</sub> elevados, torna improvável a presença desta deficiência na população estudada, visto que, nos casos de anemias ferroprivas, os níveis de Hb A<sub>2</sub> encontram-se diminuídos [41].

No Brasil, estudos anteriores mostraram importantes diferenças regionais com relação ao perfil mutacional determinante de beta talassemia no país. A região sudeste, por exemplo, tem na mutação Codon 39 C>T a maior representação em relação à freqüência alélica (64%), ao passo que nos estados da região nordeste do país observa-se maior freqüência da mutação IVSI 6 T>C (62,8%) [2, 3]. Desta forma, vê-se que o perfil genotípico dos pacientes beta talassêmicos no Brasil apresenta grande variabilidade, o que foi comprovado através da aplicação do teste qui-quadrado para comparação de freqüências entre as diferentes regiões brasileiras estudadas em nível molecular para a doença ( $p < 0,001$ ). Portanto, seria arbitrário inferir como representativos da população

brasileira dados oriundos de amostragens regionais. É necessário que outros estados brasileiros estudem seus genótipos, tornando possível o melhor entendimento da doença e o estabelecimento de políticas de saúde adequadas.

**Tabela 1.** Mutações para beta talassemia obtidas na casuística estudada e sua repercussão em nível fenotípico.

Localização	Mutação	Fenótipo
-29	A>G	$\beta^+$
+20	C>G	$\beta^+$
Cd 15	G>A	$\beta^\circ$
IVSI-(-1) ou Cd 30	G>C	$\beta^\circ$
IVSI-1	G>A	$\beta^\circ$
IVSI-5	G>A	$\beta^\circ$
IVSI-6	C>T	$\beta^+$
IVSI-110	G>A	$\beta^+$
Cd 39	G>A	$\beta^\circ$
IVSII-850	- G	$\beta^\circ$

**Tabela 2.** Frequência alélica das mutações responsáveis pela maioria dos casos de beta talassemia em alguns países ou regiões do Mediterrâneo e/ou países colonizadores do Estado do Rio Grande do Sul, assim como dados de frequência brasileiros. Valores expressos em percentual.

	Códon 39 C>T	IVS I 110 G>A	IVS I 1 G>A	IVS I 6 T>C	Outras*	Referência
Alemanha	50	7,5	5			[19, 43, 42]
Itália						
<i>Sardenha</i>	95,7					[5, 6, 34, 35]
<i>Calabria</i>	34,33	19,03	6,72	17,91		[21]
<i>Sicília</i>	34,52	24,11	9	15,37		[39]
<i>Genova</i>	33,3	15	10	18,3		[30]
<i>Delta Po</i>	61,5	25,6	2,6	2,6		[34]
Polônia	4	2	21	32		[47]
Grécia	17	42,5	13,2	7,2		[17, 14]
Portugal	38	10	28	17		[12]
Tunísia	43,8	10,8				[9, 11]
Brasil						
<i>Pernambuco</i>	3,5	8,2	15,1	62,8		[2]
<i>São Paulo</i>	64	20	5	7		[3]
<i>Porto Alegre</i>	50,9	18,1	12,9	9,5	8,6	este estudo

\* Outras mutações encontradas no presente estudo incluem a mutação do códon 15 (TGG>TGA), mutação na posição +20 da região promotora, IVSII 850 (-G), IVSI 5 (G>A), IVSI(-1) ou cd 30 (G>C) e mutação na posição -29 da região promotora).

**Tabela 3.** Comparação de médias para as mutações mais freqüentes na casuística analisada.

Índice	Genótipo 1*	Genótipo 2*	Média	p
VCM	CD39	IVSI 110	68,53	0,017
	(média = 63,87)	IVSI 1	63,99	1,000
		IVSI 6	70,61	0,009
HCM	CD39	IVSI 110	21,51	0,014
	(média = 19,93)	IVSI 1	20,06	0,999
		IVSI 6	22,76	0,000

\* o genótipo 1 representa a categoria mais freqüente, que teve sua média comparada com os demais (genótipo 2).



**Tabela 4.** Tabela de comparação dos índices em relação aos fenótipos.

	$\beta^{\circ}$	$\beta^{+}$	p
Hb <sup>a</sup>	10,97	11,64	0,022
VCM <sup>a</sup>	63,76	68,88	0,002
HCM <sup>b</sup>	19,90	21,65	0,000
CHCM <sup>a</sup>	31,19	31,69	0,017
RET% <sup>a</sup>	1,98	1,34	0,031
Hb A <sub>2</sub> <sup>a</sup>	5,47	4,63	0,000

<sup>a</sup> Teste t , comparação de médias

<sup>b</sup> Teste de Mann-Whitney

## Referências Bibliográficas

1. Angastiniotis M, Modell B. Global Epidemiology of Hemoglobin Disorders. Cooley's Anemia Seventh Symposium (1998) Ann. N. Y. Acad. Sci. Published by the New York Academy of Sciences Any AA9850. Editor Alan R. Cohen. 850:251-69.
2. Araujo AS, Silva WA, Leao SA, Bandeira FC, Petrou M, Modell B, Zago, MA (2003) A different molecular patterns of beta-thalassemia mutation in northeast Brazil. Hemoglobin 27:211-7.
3. Bertuzzo CS, Sonati MF, Costa FF (1997) Hematological phenotype and the type of  $\beta$ -thalassemia mutation in Brazil. Braz. J. Genet. 20:319-321.
4. Beutler E (2001) Discrepancies between genotype and phenotype in hematology: an important frontier. Blood 98:2597-602.
5. Cao A, Rosatelli C, Pirastu M, Galanello R. Thalassemias in Sardinia: molecular pathology, phenotype-genotype correlation, and prevention (1991) Am J Pediatr Hematol Oncol 13:179-88.
6. Cao A, Rosatelli C, Pirastu M, Galanello R (1991) Thalassemias in Sardinia: molecular pathology, phenotype-genotype correlation, and prevention. Am J Pediatr Hematol Oncol 13:179-88.
7. Cao A, Rosatelli MC, Monni G, Galanello R (2002) Screening for thalassemia: a model of success. Obstet. Gynecol. Clin. North Am 29:305-28.
8. Chakrabarti P, Gupta R, Mishra A, Rai M, Singh VP, Dash D (2005) Spectrum of beta-thalassemia mutations in North Indian states: a beta-thalassemia trait with two mutations in *cis*. Clin. Biochem. 38:576-8.

9. Chouk I, Daoud BB, Mellouli F, Bejaouli F, Gerard N, Dellagi K, Abbes S (2004) Contribution to the description of the beta-thalassemia spectrum in Tunisia and the origin of mutation diversity. *Hemoglobin* 28:189-95.
10. El-Hazmi MA, Al-Swailem AR, Warsy AS (1995) Molecular defects in beta-thalassaemias in the population of Saudi Arabia. *Hum. Her.* 45:278-85.
11. Fattoum S, Messaoud T, Bibi A (2004) Molecular basis of beta-thalassemia in the population of Tunisia. *Hemoglobin* 28:177-87.
12. Faustino P, Pacheco P, Loureiro P, Nogueira PJ, Lavinha J (1999) The geographic pattern of beta-thalassaemia mutations in the portuguese population. *Br. J. Haematol.* 107:903-4.
13. Frosi VM, Mioranza C (1975) Inícios da Imigração – Processos de estabelecimento. In: Frosi, VM, Mioranza C (eds). *Imigração Italiana no Nordeste do Rio Grande do Sul*. Coedições Universidade de Caxias do Sul/Instituto Superior Brasileiro Italiano de Estudos e Pesquisas. Porto Alegre, Movimento, pp 38-42.
14. Georgiou I, Makis A, Chaidos A, Bouba I, Hatzi E, Kranas V, Zilidis C, Bourantas KL (2003) Distribution and frequency of beta-thalassemia mutations in northwestern and central Greece. *Eur. J. Haematol.* 70:75-8.
15. Harju S, McQueen KJ, Peterson KR. Chromatin Structure and Control of  $\beta$ -Like Globin Gene Switching (2002) *Exp. Biol. Med.* 227:683-700.
16. Huisman THJ, Carver MFH & Bysal E (1997). *A Syllabus of Thalassemia Mutations*. The Sickle Cell Anemia Foundation, Augusta, USA.
17. Kattamis C, Hu H, Cheg G, Reese AL, Gonzalez RJM, Kutlar A, Kutlar F, Huisman TH (1990) Molecular characterization of beta-thalassaemia in 174 Greek patients with thalassaemia major. *Br. J. Haematol.* 74:342-6.

18. Kyriacou K, Al Quobaili F, Pavlou E, Christopoulos G, Ioannou P, Kleanthous M (2000) Molecular characterization of beta-thalassemia in Syria. *Hemoglobin* 24:1-13.
19. Laig M, Pape M, Hundrieser J, Flatz G (1990) Mediterranean types of  $\beta$ -thalassemia in the German population. *Hum. Genet.* 85:135-7.
20. Lau YL, Chan LC, Chan YY, Ha SY, Yeung CY, Waye JS, Chui DH (1997) Prevalence and genotypes of  $\alpha$  e  $\beta$ -thalassemia carriers in Hong Kong: implications for population screening. *N. Engl. J. Med.* 336:1298-301.
21. Magro S, Santilli E, Mancuso R, Puzzonnia P, Consarino C, Morgione S, Galati MC, Fersini G, Madonna G, Brancati C, Vadalà P, Molica S (1995) Spectrum of  $\beta$ -thalassemia Mutations in Calabria: Implications for Prenatal Diagnosis. *Am. J. Hematol.* 48:128-9.
22. Makhoul NJ, Wells RS, Kaspar H, Shbaklo H, Taher A, Chakar N, Zalloua PA (2005) Genetic heterogeneity of Beta thalassemia in Lebanon reflects historic and recent population migration. *Ann. Hum. Genet.* 69(Pt 1):55-66.
23. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A Simple salting out for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16:1215.
24. Miranda SRP, Fonseca SF, Figueiredo MS, Yamamoto M, Grotto HZW, Saad STO. et al . Hb Köln [a2b298(FG5) val-met] identified by DNA analysis in a Brazilian family. *Braz. J. Genet.* [periódico na Internet]. 1997 Dez [citado 2006 Out 26]; 20(4): . Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-84551997000400030&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84551997000400030&lng=pt&nrm=iso). doi: 10.1590/S0100-84551997000400030.
25. Muniz A, Martinez G, Lavinha J, Pacheco P (2000) Beta-thalassemia in Cubans: novel allele increases the genetic diversity at the HBB locus in the Caribbean. *Am. J. Hematol.* 64:7-14.
26. Olivieri NF. The  $\beta$ -Thalasseмииs (1999) *N. Engl. J. Med.* 341:99-109.

27. Park SS, CHO HI (2002) Beta-thalassemia in the Korean population. *Int. J. Hematol.* 76 Suppl 2:93-5.
28. Park SS, Lee YJ, Kim JY, Joo SI, Hattori Y, Ohba Y, Cho HI (2002) Beta-thalassemia in the Korean population. *Hemoglobin* 26:135-45.
29. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD (2003) Color and genomic ancestry in brazilians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:177-82.
30. Rady MS, Baffico M, Khalifa AS, Heshmat NM, El-Moselhy S, Sciarratta GV et al (1997) Identification of Mediterranean beta-thalassemia mutations by reverse dot-blot in Italians and Egyptians. *Hemoglobin* 21:59-69.
31. Riou J, Godart C, Hurtrel D, Mathis M, Bimet C, Bardakdjian-Michau J, Prehu C, Wajcman H, Galacteros F (1997) Cation-exchange HPLC evaluated for presumptive identification of hemoglobin variants. *Clin. Chem.* 43:34-9.
32. Roldan A, Gutierrez M, Cygler A, Bonduel M, Sciuccati G, Torres AF (1997) Molecular Characterization of  $\beta$ -Thalassemia Genes in an Argentine Population. *Am. J. Hematol.* 54:179-82.
33. Romana M, Keclard L, Guillemin G, Lavocat E, Saint-Martin C, Berchel C, Merault G (1996) Molecular Characterization of beta-thalassemia mutations in Guadeloupe. *Am. J. Hematol.* 53:228-33.
34. Rosatelli MC, Tuveri T, Scalas MT, Leoni GB, Sardu R, Faa V, Meloni A, Pishedda MA, Demurtas M, Monni G et al (1992) Molecular screening and fetal diagnosis of beta-thalassemia in the italian population. *Hum. Genet.* 89:585-9.
35. Rosatelli MC, Dozy A, Faa V, Meloni A, Sardu R, Saba L, Kan YW, Cao A (1992) Molecular characterization of beta-thalassemia in the Sardinian population. *Am. J. Hum. Genet.* 50:422-6.
36. Rund D, Rachmilewitz E (2005)  $\beta$ -Thalassemia. *N. Engl. J. Med.* 353:1135-46.

37. Rund D, Filon D, Strauss N, Rachmilewitz EA, Oppenheim A (1992) Mean corpuscular volume of heterozygotes for beta-thalassemia correlates with the severity of mutations. *Blood* 79(1):238-43.
38. Salzano FM, Bortolini, MC (2002). The evolution and genetics of Latin American populations. Cambridge University Press, Cambridge.
39. Schilirò G, DI Gregorio F, Samperi P, Mirabile E, Liang R, Cürük MA, YE Z, Huisman TH J (1995) Genetic Heterogeneity of  $\beta$ -thalassemia in Southeast Sicily. *Am. J. Hematol.* 48:5-11.
40. Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD (2001) The Phylogeography of Brazilian Y-Chromosome Lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 68:281-6.
41. Steinberg MH, Adams JG 3<sup>rd</sup> (1991). Hemoglobin A2: origin, evolution, and aftermath. *Blood* 78:2165-77.
42. Schwarz C, Vetter B, Kohne E, Kulozik AE (1997) Beta thalassemia in Germany: molecular genetics and clinical phenotype in immigrant and in the native population. *Klin Padiatr* 209:172-7.
43. Vetter B, Schwarz C, Kohne E, Kulozik AE (1997) Beta-thalassemia in the immigrant and non-immigrant German populations. *Br. J. Haematol.* 97:266-72.
44. Villegas A, Ropero P, Gonzalez FA, Anguita E, Espinos D (2001) The thalassemia syndromes: molecular characterization in the Spanish population. *Hemoglobin* 25:273-83.
45. Weatherall DJ, Clegg JB (2001) Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull. World Health Organ.* 79:704-712.
46. Zago MA, Costa FF, Tone LG, Bottura C (1983) Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population. *Hum. Hered.* 33:125-9.

47. Zdebska E, Krawcewicz A, Adamowicz AS, Jackowska T, Tejza B, Strojny W, Kuliszkiewicz JM, Mokras U, Koscielak J (2006) Beta-Thalassemia in Poland. Mediterranean mutations in beta-thalassemia. *Pol Merkuriusz Lek* 20:53-6.
48. Zembrzuski VM, Callegari-Jacques SM, Hutz, MH (2006) Application of an african ancestry index as a genomic control approach in a brazilian population. *Ann. Hum. Genet.*70(Pt 6):822-8.
49. Zeng Y, Huang S (2001) The studies of hemoglobinopathies and thalassemia in China – the experiences in Shangai Institute of Medical Genetics. *Clin. Chim. Acta* 313:107-11.

## Identification of $\beta$ Thal Mutations in Southern Brazilians.

Vivian C.D. Reichert. Simone M. de Castro. Sandrine C.Wagner. Dulcinéia M. de Albuquerque. Mara H. Hutz. Sandra Leistner-Segal.

Corresponding author:

Vivian Caroline Dadalt Reichert

João Pessoa, 339/104 B

Porto Alegre CEP 90040-000

Tel: 55 51 3028 0646

E-mail: [vdadalt@terra.com.br](mailto:vdadalt@terra.com.br)

Keywords: hemoglobin, thalassemias, genotypes, Brazil, gene sequencing, HPLC.

---

Vivian C.D. Reichert (✉) . Sandra L. Segal. Serviço de Genética Médica – Laboratório de Genética Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS, CEP 90035-003, Brasil - Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2400, Porto Alegre, RS, CEP 90035-003, Brazil

Simone M. de Castro. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Sandrine C.Wagner. Centro Universitário FEEVALE, Novo Hamburgo, RS, Brazil

Mara H. Hutz. Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Dulcinéia M. de Albuquerque. Hemocentro, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil

Financial Support: FIPE / Hospital de Clínicas de Porto Alegre



## Abstract

We evaluated the mutation profile in a sample of 127 unrelated  $\beta$ -thal individuals, diagnosed through  $A_2$  and foetal hemoglobin quantification by HPLC (high-performance liquid chromatography) and coming from the southern most state of Brazil, where a flow of Italian immigrants happened in the late 19<sup>th</sup> century, mainly coming from Northern Italy and some individuals from Southern. The molecular analysis was performed by DNA sequencing of the most common mutations found in the Mediterranean region. The  $\beta^0$  codon 39 nonsense mutation was the most frequent alteration (50,9%), followed, by  $\beta^+$  IVSI 110 G>A (18,1%),  $\beta^0$  IVSI 1 G>A (12,9%),  $\beta^+$  IVSI 6 T>C (9,5%) and other rare mutations (8,6%). The chosen gene sequence was able to identify 90,6% of  $\beta$ -thal mutations in the population studied, showing some similarity with allele frequencies of the mainly colonizer countries of Rio Grande do Sul state. The comparison of our results with other Brazilian studies showed significant differences. Therefore, we can conclude that the genotypic profile of  $\beta$ -thal shows great variability. Hence, it would be arbitrary to infer as representative of the whole Brazilian population results stemming from regional studies. It is necessary that other Brazilian states study their genotypes, making possible a better understanding of this disease and the establishment of adequate public health policies.

The  $\beta$  thalassemys are an heterogeneous group of genetic diseases of hemoglobin synthesis with Mediterranean Region origin, widespread throughout the Southeast Asia, including Southern China, Indian subcontinent, the Malay Peninsula, Indonesia and black population groups [36, 7].

More than 200 different mutations in beta gene locus can cause  $\beta$ -thal, with absence ( $\beta^0$  thal) or reduction ( $\beta^+$  thal) of the synthesis of  $\beta$ -globin chains [36, 26, 15, 45]. In a review, Huisman et al identified and classified the most frequent  $\beta$ -thal alleles, showing that 20 mutations are responsible for about 80% of the disease cases [16]. Clinically, the  $\beta$ -thal are heterogeneous diseases because of the wide variety of gene lesions that cause the unbalance in the synthesis of  $\beta$ -globin chains, meaning that the defect in a specific locus does not explain the phenotypic variability in individuals with the same genotype, suggesting that another genetic modulators can coexist [4]. Although this condition occurs more frequently in the tropics, the migration flows made possible its dissemination through other areas. Nowadays, there are thalassemy gene carriers and other hemoglobin disorders in Europe, Americas, and Australia [45, 1]. Molecular studies have already identified different molecular defects on the beta globin gene in different populations [19, 44, 5, 6, 34, 35, 47, 12, 20, 49, 8, 27, 28, 33, 25, 32, 3, 2, 18, 22, 10, 9, 11].

Brazilians are one of the most heterogeneous population in the world, as a result of five centuries of interethnic crosses of peoples from three continents: the European colonizers, mainly represented by the Portuguese, the African slaves, and the autochthonous Amerindians [40, 29]. Within a country of continental size, such as Brazil, the population composition varies widely among regions, but the Southern Brazilian population differs from this general pattern, as demonstrated by early studies that evaluated the admixture grade in this population, which is mainly formed by Portuguese descendents, although Italians, Spaniards and Germans have also contributed to its gene pool. A review about the ethnic admixture in Brazilian and other Latin American populations was recently published by Salzano & Bortolini [38]. These authors also showed a good agreement between morphologic classification, based on skin colour and morphological traits, and genetic estimates of admixture. Using ancestry genetic markers, Zembrzuski et al demonstrated that people classified as white through color skin have 6% degree of African admixture in Rio Grande do Sul state [48].

In Southern Brazil there was a high level of immigration in the late 19<sup>th</sup> century, mainly coming from Northern Italy and some individuals from the Southern [13]. Based on this fact, the present study aimed to determine the genotypic profile in a sample of  $\beta$ -thal individuals of Rio Grande do Sul, Brazil.

This study was approved by Research Ethic Committee of the participating institutions and all of the individuals included in the sample studied have authorized their participation in the research signing up an Agreement Term. The studied sample included 127 individuals (89 of which were females and 36 males, at a medium of 37 years old), 124 of which were classified as  $\beta$ -thal carriers based on A<sub>2</sub> haemoglobin quantification, 1 homozygous and 2 with  $\beta$ -thal associated with S haemoglobin presence totaling 128 analyzed chromosomes. All the subjects came from Rio Grande do Sul state, located in the Southern Brazil and were assisted at Weinmann Laboratory, a private company, and at the Haemoglobin Centre of the Pharmacy School of Rio Grande do Sul University between March 2003 and December 2004. The cases included in this study had a previous diagnoses compatible with the possible presence of some  $\beta$ -thal allele through A<sub>2</sub> and foetal haemoglobin quantification by eletrophoretic and/or chromatographic proceedings [31].

The blood samples were collected in vacuum tubes, using EDTA as anticoagulant. The hematological indices as well as the reticulocytes and their fluorescence populations were obtained through a blood counting device, Sysmex SE9500 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan), that is based on flow citrometry methodology to determine the values mentioned above and the direct staining of the RNA content referring to the reticulocytes. The A<sub>2</sub> and foetal haemoglobin were quantified by high performance liquid chromatographic (HPLC-VARIANT, Bio-Rad, Milan, Italy).

Genomic DNA was obtained from the peripheral blood samples through salting out proceeding as described by Miller [23] and amplified through polymerase chain reaction as described by Miranda [24], using P1 and P5 primers located at -161 to -147 position on promoter region and 115 to 95 position on the IVS 2 region of beta globin gene, respectively, performing a 771 pb fragment, and 58 and P7 primers, located at 738 to 756 position on IVS 2 and 1562 to 1542 position on 3`UTR region in the same gene, performing a 430 pb fragment. After purification, the PCR products underwent DNA sequencing, by using internal primers to cover the gene regions where the most common  $\beta$ -thal mutations found in the Mediterranean populations are located [6, 35, 35, 21, 39], according to standard protocols for MegaBACE 1000, using the DYEnamic ET Dye

Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Inc Cleveland, Ohio, USA).

Related to statistical analysis, the results were analyzed using frequency distribution, *t* test and Mann-Whitney test to compare the mean values between hematological indices of  $\beta^0$  and  $\beta^+$  groups. For heterozygous, the mean values of blood indices were performed using analysis of variance and Tukey test to multiple comparisons. The comparison between the allele frequencies encountered in this study and other frequencies in Brazil was performed using chi-square test. In all the cases, Statistical Package for Social Science (SPSS, Inc, Chicago, Illinois) was used.

Between March 2003 and December 2004 127 subjects were analyzed. Table 1 shows the  $\beta$ -thal alleles found in this sample. It was possible to identify the  $\beta$ -thal mutation in 116 of the 127 individuals studied, of which 34 were phenotypically  $\beta^+$  and 82  $\beta^0$ . Table 2 shows the distribution of alleles among the  $\beta$ -thal individuals in this study, as well as the frequencies observed in the mainly colonizer countries of Rio Grande do Sul state and also in other Brazilian regions.

The methodology applied prioritized the detection of the most frequent mutations in the Mediterranean region. The  $\beta^0$  codon 39 nonsense mutation was the most frequent alteration (50,9%), followed, by  $\beta^+$  IVSI 110 G>A (18,1%),  $\beta^0$  IVSI 1 G>A (12,9%),  $\beta^+$  IVSI 6 T>C (9,5%) and other rare mutations (8,6%). The other mutations included 2 cases of the codon 15 stop codon (TGG>TGA), 2 cases of the +20 mutation on promoter region, 1 case with IVSI-5 (G>A) mutation, 1 case of the -29 promoter region mutation and 1 case of IVSI(-1) or codon 30 (AGG>ACG) mutation.

After analysis of the gene sequence we were able to identify 90,6% of  $\beta$ -thal mutations in this sample. In 12 cases (9,4%), no mutation on the chosen gene sequence were found.

Phenotypically, in 116 chromosomes analyzed where we were able to find the  $\beta$ -thal mutation, we found 34 cases with the  $\beta^+$  phenotype, in which the IVSI 110 G>A occurred more frequently (21 of 34 cases, 61,8%) and for the  $\beta^0$  phenotype the codon 39 nonsense mutation was the most frequent (59 of 82 cases, 71,9%).

The variance analysis showed statistically significant differences considering 5% of significance level between the VCM and HCM indices for the carriers of studied mutations. A multiple comparison analysis showed that this difference has occurred between the group of codon 39 nonsense and IVS-I nt 110 G>A mutation (*p* value=0,017 to VCM and

0,014 related to HCM) and between the codon 39 nonsense and IVS-I nt 6 T>C mutation (p value=0,009 to VCM and <0,001 related to HCM)(table 3).

The mean comparisons between  $\beta^0$  and  $\beta^+$  groups showed statistically significant difference between the Hb indices (p value=0,022), VCM (p value=0,002), HCM (p value<0,001), CHCM (p value=0,022), reticulocytes (p value=0,028), and HbA<sub>2</sub> (p value<0,001), as seen in table 4.

The epidemiology information related to  $\beta$ -thal disorders are difficult to obtain, because most countries have an uneven distribution of carriers. One example is Italy, where frequency varies from 1-2% in most of the North, reaching 12% in Sardinia and Ferrara. The average for the whole country is 5%. Contributing to this fact, in many countries, several ethnic groups coexist. This is especially so in countries where the haemoglobin disorders have been brought by immigrants. The main examples of the later situation are Northern Europe and the USA. Another example is Oman, where the Belushi tribe, which settled there from Iran and Pakistan (Beluchistan), has a very high carrier rate (10%) compared to the indigenous Arab population (1-2%). This micromapping is also important since it helps to direct services to the at-risk groups [1].

Therefore, accurate epidemiological information throughout the world are not yet available, and few regions are totally mapped. Although there are some studies in the haemoglobinopathies field in Brazil, the real prevalence of the disease is unknown, which can be attributed to great regional differences related to ethnic roots [46].

The present study analyzed the spectrum of  $\beta$ -thal genes in a group of individual coming from Rio Grande do Sul state, an ethnic group that had not yet been studied at the molecular level for this disease. Because of the immigration characteristic of Southern Brazil, basically colonized by Europeans that settled there in the late 19<sup>th</sup> century, we choose gene sequences that contains the most common mutations found in the Mediterranean countries. Interestingly, analysis of the codon 39 nonsense mutation, IVSI 110 G>A, IVSI 6 T>C and IVSI 1 G>A mutations allowed us to identify the  $\beta$ -thal mutation in 91,4% of the cases. The comparison of our results with the allele frequencies of other Mediterranean populations and/or other colonizer countries of Rio Grande do Sul shows some similarity.

The comparison of identified mutations with the blood indices obtained, was consistent with previous studies considering the variety of encountered mutations and also grouping in  $\beta^+$  and  $\beta^0$  mutations, although confounding factors as concomitant presence of alpha thalassemia, that have also influence in these indices, has not been

controlled [37]. In the same way, concomitant presence of iron deficiency have influence in the above cited indices. However, this study was designed based on the Hb A<sub>2</sub> levels as an inclusion criteria, which makes improbable the presence of this deficiency in the studied population, because in the iron deficiencies the Hb A<sub>2</sub> levels were found decreased [41].

In Brazil, previous studies have showed important regional differences related to the mutational profile of  $\beta$ -thal carriers in the country. The Southeast region, for example, have in codon 39 nonsense its most frequent mutation, but in the Northeast we can see the IVSI 6 T>C more frequently (62,8%) [2, 3]. As we mentioned, it is possible to see that the genotypic profile of  $\beta$ -thal carriers in Brazil shows great variability, as demonstrated through a qui-square test to compare frequencies between different Brazilian regions studied at molecular level (p value<0,001). However, it would be arbitrary to infer as representative of Brazilian population results coming from regional samples. It is necessary that other Brazilian state study their genotypes, making possible a better understanding of this disease and the establishment of adequate public health polices.

**Table 1.**  $\beta$ -thal mutations found in the sample studied and their phenotypic consequences.

Location	Mutation	Phenotype
-29	A>G	$\beta^+$
+20	C>G	$\beta^+$
Cd 15	G>A	$\beta^\circ$
IVSI(-1) ou Cd 30	G>C	$\beta^\circ$
IVSI-1	G>A	$\beta^\circ$
IVSI-5	G>A	$\beta^\circ$
IVSI-6	C>T	$\beta^+$
IVSI-110	G>A	$\beta^+$
Cd 39	G>A	$\beta^\circ$
IVSII-850	- G	$\beta^\circ$

**Table 2.** Allele frequencies responsible for the majority of the  $\beta$ -thal in some countries or Mediterranean regions and/or colonizers of Rio Grande do Sul state, as well some Brazilian frequencies. Results shown in percentage.

	Códon 39 C>T	IVS I 110 G>A	IVS I 1 G>A	IVS I 6 T>C	Others*	References
Germany	50	7,5	5			[19, 43, 42]
Italy						
<i>Sardinia</i>	95,7					[5, 6, 34, 35]
<i>Calabria</i>	34,33	19,03	6,72	17,91		[21]
<i>Sicília</i>	34,52	24,11	9	15,37		[39]
Polônia	4	2	21	32		[47]
Greece	17	42,5	13,2	7,2		[17, 14]
Portugal	38	10	28	17		[12]
Tunisia	43,8	10,8				[9, 11]
Brazil						
<i>Pernambuco</i>	3,5	8,2	15,1	62,8		[2]
<i>São Paulo</i>	64	20	5	7		[3]
<i>Porto Alegre</i>	50,9	18,1	12,9	9,5	8,6	present study

\* Another mutations found in this study includes the codon 15 (TGG→TGA), +20 mutation on promoter region, IVSI 5 G>A mutation, -29 on promoter region mutation and IVSI(-1) or codon 30 (AGG>ACG) mutation.



**Table 3.** Mean comparison between the most common mutations found.

Índice	Genotype 1*	Genotype 2*	Mean	p
VCM	CD39	IVSI 110	68,53	0,017
	(média = 63,87)	IVSI 1	63,99	1,000
		IVSI 6	70,61	0,009
HCM	CD39	IVSI 110	21,51	0,014
	(média = 19,93)	IVSI 1	20,06	0,999
		IVSI 6	22,76	0,000

\* the genotype 1 represents the most frequent category, that had its mean value compared with the others (genotype 2).

**Table 4.** Comparison between blood indices and phenotypes.

	$\beta^{\circ}$	$\beta^{+}$	p
Hb <sup>a</sup>	10,97	11,64	0,022
VCM <sup>a</sup>	63,76	68,88	0,002
HCM <sup>b</sup>	19,90	21,65	0,000
CHCM <sup>a</sup>	31,19	31,69	0,017
RET% <sup>a</sup>	1,98	1,34	0,031
Hb A <sub>2</sub> <sup>a</sup>	5,47	4,63	0,000

<sup>a</sup> *t* test

<sup>b</sup> Mann-Whitney test

## References

1. Angastiniotis M, Modell B. Global Epidemiology of Hemoglobin Disorders. Cooley's Anemia Seventh Symposium (1998) Ann. N. Y. Acad. Sci. Published by the New York Academy of Sciences Any AA9850. Editor Alan R. Cohen. 850:251-69.
2. Araujo AS, Silva WA, Leao SA, Bandeira FC, Petrou M, Modell B, Zago, MA (2003) A different molecular patterns of beta-thalassemia mutation in northeast Brazil. Hemoglobin 27:211-7.
3. Bertuzzo CS, Sonati MF, Costa FF (1997) Hematological phenotype and the type of  $\beta$ -thalassemia mutation in Brazil. Braz. J. Genet. 20:319-321.
4. Beutler E (2001) Discrepancies between genotype and phenotype in hematology: an important frontier. Blood 98:2597-602.
5. Cao A, Rosatelli C, Pirastu M, Galanello R. Thalassemias in Sardinia: molecular pathology, phenotype-genotype correlation, and prevention (1991) Am J Pediatr Hematol Oncol 13:179-88.
6. Cao A, Rosatelli C, Pirastu M, Galanello R (1991) Thalassemias in Sardinia: molecular pathology, phenotype-genotype correlation, and prevention. Am J Pediatr Hematol Oncol 13:179-88.
7. Cao A, Rosatelli MC, Monni G, Galanello R (2002) Screening for thalassemia: a model of success. Obstet. Gynecol. Clin. North Am 29:305-28.
8. Chakrabarti P, Gupta R, Mishra A, Rai M, Singh VP, Dash D (2005) Spectrum of beta-thalassemia mutations in North Indian states: a beta-thalassemia trait with two mutations in *cis*. Clin. Biochem. 38:576-8.

9. Chouk I, Daoud BB, Mellouli F, Bejaouli F, Gerard N, Dellagi K, Abbes S (2004) Contribution to the description of the beta-thalassaemia spectrum in Tunisia and the origin of mutation diversity. *Hemoglobin* 28:189-95.
10. El-Hazmi MA, Al-Swailem AR, Warsy AS (1995) Molecular defects in beta-thalassaemias in the population of Saudi Arabia. *Hum. Her.* 45:278-85.
11. Fattoum S, Messaoud T, Bibi A (2004) Molecular basis of beta-thalassaemia in the population of Tunisia. *Hemoglobin* 28:177-87.
12. Faustino P, Pacheco P, Loureiro P, Nogueira PJ, Lavinha J (1999) The geographic pattern of beta-thalassaemia mutations in the portuguese population. *Br. J. Haematol.* 107:903-4.
13. Frosi VM, Mioranza C (1975) Inícios da Imigração – Processos de estabelecimento. In: Frosi, VM, Mioranza C (eds). *Imigração Italiana no Nordeste do Rio Grande do Sul*. Coedições Universidade de Caxias do Sul/Instituto Superior Brasileiro Italiano de Estudos e Pesquisas. Porto Alegre, Movimento, pp 38-42.
14. Georgiou I, Makis A, Chaidos A, Bouba I, Hatzi E, Kranas V, Zilidis C, Bourantas KL (2003) Distribution and frequency of beta-thalassaemia mutations in northwestern and central Greece. *Eur. J. Haematol.* 70:75-8.
15. Harju S, McQueen KJ, Peterson KR. Chromatin Structure and Control of  $\beta$ -Like Globin Gene Switching (2002) *Exp. Biol. Med.* 227:683-700.
16. Huisman THJ, Carver MFH & Bysal E (1997). *A Syllabus of Thalassaemia Mutations*. The Sickle Cell Anemia Foundation, Augusta, USA.
17. Kattamis C, Hu H, Cheg G, Reese AL, Gonzalez RJM, Kutlar A, Kutlar F, Huisman TH (1990) Molecular characterization of beta-thalassaemia in 174 Greek patients with thalassaemia major. *Br. J. Haematol.* 74:342-6.

18. Kyriacou K, Al Quobaili F, Pavlou E, Christopoulos G, Ioannou P, Kleanthous M (2000) Molecular characterization of beta-thalassemia in Syria. *Hemoglobin* 24:1-13.
19. Laig M, Pape M, Hundrieser J, Flatz G (1990) Mediterranean types of  $\beta$ -thalassemia in the German population. *Hum. Genet.* 85:135-7.
20. Lau YL, Chan LC, Chan YY, Ha SY, Yeung CY, Waye JS, Chui DH (1997) Prevalence and genotypes of  $\alpha$  e  $\beta$ -thalassemia carriers in Hong Kong: implications for population screening. *N. Engl. J. Med.* 336:1298-301.
21. Magro S, Santilli E, Mancuso R, Puzzon P, Consarino C, Morgione S, Galati MC, Fersini G, Madonna G, Brancati C, Vadalà P, Molica S (1995) Spectrum of  $\beta$ -thalassemia Mutations in Calabria: Implications for Prenatal Diagnosis. *Am. J. Hematol.* 48:128-9.
22. Makhoul NJ, Wells RS, Kaspar H, Shbaklo H, Taher A, Chakar N, Zalloua PA (2005) Genetic heterogeneity of Beta thalassemia in Lebanon reflects historic and recent population migration. *Ann. Hum. Genet.* 69(Pt 1):55-66.
23. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A Simple salting out for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16:1215.
24. Miranda SRP, Fonseca SF, Figueiredo MS, Yamamoto M, Grotto HZW, Saad STO. et al . Hb Köln [a2b298(FG5) val-met] identified by DNA analysis in a Brazilian family. *Braz. J. Genet.* [periódico na Internet]. 1997 Dez [citado 2006 Out 26]; 20(4): . Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-84551997000400030&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84551997000400030&lng=pt&nrm=iso). doi: 10.1590/S0100-84551997000400030.
25. Muniz A, Martinez G, Lavinha J, Pacheco P (2000) Beta-thalassemia in Cubans: novel allele increases the genetic diversity at the HBB locus in the Caribbean. *Am. J. Hematol.* 64:7-14.
26. Olivieri NF. The  $\beta$ -Thalasseмииs (1999) *N. Engl. J. Med.* 341:99-109.

27. Park SS, CHO HI (2002) Beta-thalassemia in the Korean population. *Int. J. Hematol.* 76 Suppl 2:93-5.
28. Park SS, Lee YJ, Kim JY, Joo SI, Hattori Y, Ohba Y, Cho HI (2002) Beta-thalassemia in the Korean population. *Hemoglobin* 26:135-45.
29. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD (2003) Color and genomic ancestry in brazilians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:177-82.
30. Rady MS, Baffico M, Khalifa AS, Heshmat NM, El-Moselhy S, Sciarratta GV et al (1997) Identification of Mediterranean beta-thalassemia mutations by reverse dot-blot in Italians and Egyptians. *Hemoglobin* 21:59-69.
31. Riou J, Godart C, Hurtrel D, Mathis M, Bimet C, Bardakdjian-Michau J, Prehu C, Wajcman H, Galacteros F (1997) Cation-exchange HPLC evaluated for presumptive identification of hemoglobin variants. *Clin. Chem.* 43:34-9.
32. Roldan A, Gutierrez M, Cygler A, Bonduel M, Sciuccati G, Torres AF (1997) Molecular Characterization of  $\beta$ -Thalassemia Genes in an Argentine Population. *Am. J. Hematol.* 54:179-82.
33. Romana M, Keclard L, Guillemin G, Lavocat E, Saint-Martin C, Berchel C, Merault G (1996) Molecular Characterization of beta-thalassemia mutations in Guadeloupe. *Am. J. Hematol.* 53:228-33.
34. Rosatelli MC, Tuveri T, Scalas MT, Leoni GB, Sardu R, Faa V, Meloni A, Pishedda MA, Demurtas M, Monni G et al (1992) Molecular screening and fetal diagnosis of beta-thalassemia in the italian population. *Hum. Genet.* 89:585-9.
35. Rosatelli MC, Dozy A, Faa V, Meloni A, Sardu R, Saba L, Kan YW, Cao A (1992) Molecular characterization of beta-thalassemia in the Sardinian population. *Am. J. Hum. Genet.* 50:422-6.
36. Rund D, Rachmilewitz E (2005)  $\beta$ -Thalassemia. *N. Engl. J. Med.* 353:1135-46.

37. Rund D, Filon D, Strauss N, Rachmilewitz EA, Oppenheim A (1992) Mean corpuscular volume of heterozygotes for beta-thalassemia correlates with the severity of mutations. *Blood* 79(1):238-43.
38. Salzano FM, Bortolini, MC (2002). The evolution and genetics of Latin American populations. Cambridge University Press, Cambridge.
39. Schilirò G, DI Gregorio F, Samperi P, Mirabile E, Liang R, Cürük MA, YE Z, Huismann TH J (1995) Genetic Heterogeneity of  $\beta$ -thalassemia in Southeast Sicily. *Am. J. Hematol.* 48:5-11.
40. Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD (2001) The Phylogeography of Brazilian Y-Chromosome Lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 68:281-6.
41. Steinberg MH, Adams JG 3<sup>rd</sup> (1991). Hemoglobin A2: origin, evolution, and aftermath. *Blood* 78:2165-77.
42. Schwarz C, Vetter B, Kohne E, Kulozik AE (1997) Beta thalassemia in Germany: molecular genetics and clinical phenotype in immigrant and in the native population. *Klin Padiatr* 209:172-7.
43. Vetter B, Schwarz C, Kohne E, Kulozik AE (1997) Beta-thalassemia in the immigrant and non-immigrant German populations. *Br. J. Haematol.* 97:266-72.
44. Villegas A, Ropero P, Gonzalez FA, Anguita E, Espinos D (2001) The thalassemia syndromes: molecular characterization in the Spanish population. *Hemoglobin* 25:273-83.
45. Weatherall DJ, Clegg JB (2001) Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull. World Health Organ.* 79:704-712.
46. Zago MA, Costa FF, Tone LG, Bottura C (1983) Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population. *Hum. Hered.* 33:125-9.

47. Zdebska E, Krawcewicz A, Adamowicz AS, Jackowska T, Tejza B, Strojny W, Kuliszkiewicz JM, Mokras U, Koscielak J (2006) Beta-Thalassemia in Poland. Mediterranean mutations in beta-thalassemia. *Pol Merkuriusz Lek* 20:53-6.
48. Zembrzuski VM, Callegari-Jacques SM, Hutz, MH (2006) Application of an african ancestry index as a genomic control approach in a brazilian population. *Ann. Hum. Genet.*70(Pt 6):822-8.
49. Zeng Y, Huang S (2001) The studies of hemoglobinopathies and thalassemia in China – the experiences in Shangai Institute of Medical Genetics. *Clin. Chim. Acta* 313:107-11.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Apesar de existirem vários estudos no campo das hemoglobinopatias no Brasil, a real incidência de beta talassemias no país não é completamente conhecida, o que se pode atribuir às pronunciadas diferenças regionais em relação à etnia (Zago et al, 1983).

O presente estudo analisou o espectro de mutações para beta talassemia em uma amostra de indivíduos oriundos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, ainda não investigados em nível molecular para esta doença. Devido à característica imigratória do sul do Brasil, colonizado basicamente por europeus que aqui chegaram no início do século XIX, as regiões gênicas de escolha para o seqüenciamento de DNA foram aquelas que continham as mutações mais comumente encontradas nos países mediterrâneos. Com efeito, as mutações CD39 C>T, IVSI 110 G>A, IVSI 6 T>C e IVSI 1 G>A contemplam 91,4% dos casos com as mutações para beta talassemias esclarecidas na amostra estudada. A comparação dos resultados obtidos neste estudo com as freqüências alélicas encontradas em populações da região do Mediterrâneo e/ou países colonizadores do Estado do Rio Grande do Sul mostram certa similaridade.

Com relação à comparação do tipo de mutação identificada com os índices hematimétricos obtidos, estes foram consistentes com a literatura para as diferentes mutações encontradas e também agrupando-as pelos fenótipos  $\beta^+$  e  $\beta^0$ , apesar de fatores de confusão que também têm influência nestes índices, como a co-herança com talassemias do tipo alfa, não terem sido controlados (Rund, 1992). Da mesma forma, a presença concomitante de anemia por deficiência de ferro também tem influência direta sobre os índices supracitados. Entretanto, a forma de delineamento do estudo, no qual os indivíduos foram selecionados para inclusão a partir de níveis de Hb A<sub>2</sub> elevados, torna improvável a presença desta deficiência na população estudada, visto que, nos casos de anemias ferroprivas, os níveis de Hb A<sub>2</sub> encontram-se diminuídos (Steinberg, 1991).

No Brasil, estudos anteriores mostraram importantes diferenças regionais com relação ao perfil mutacional determinante de beta talassemia no país. A região sudeste, por exemplo, tem na mutação Codon 39 C>T a maior representação em relação à freqüência alélica (64%), ao passo que nos estados da região nordeste do país observa-se maior freqüência da mutação IVSI 6 T>C (62,8%) (Araújo, 2003; Bertuzzo, 1997). Desta forma, vê-se que o perfil genotípico dos pacientes beta talassêmicos no Brasil apresenta grande variabilidade, o que foi comprovado através da aplicação do teste qui-quadrado para comparação de freqüências entre as diferentes regiões brasileiras

estudadas em nível molecular para a doença ( $p < 0,001$ ). Portanto, seria arbitrário inferir como representativos da população brasileira dados oriundos de amostragens regionais. É necessário que outros estados brasileiros estudem seus genótipos, tornando possível o melhor entendimento da doença e o estabelecimento de políticas de saúde adequadas.

O conhecimento do perfil genotípico dos pacientes beta talassêmicos do Rio Grande do Sul é de fundamental importância para o delineamento de estudos futuros com o objetivo de identificar outros moduladores genéticos que tenham influência em nível fenotípico para esta doença.

## ANEXOS

# Annals of Hematology

## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

### 1 Legal requirements

The author(s) guarantee(s) that the manuscript will not be published elsewhere in any language without the consent of the copyright owners, that the rights of third parties will not be violated, and that the publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Authors wishing to include figures or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Manuscripts must be accompanied by the "Copyright Transfer Statement." The form can be obtained from [springeronline.com/journal/00277](http://springeronline.com/journal/00277).

Please include at the end of the acknowledgements a declaration that the experiments comply with the current laws of the country in which they were performed inclusive of ethics approval.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author(s) will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements.

### 2 Open Choice Publication

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular "subscription-based" article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please visit [www.springeronline.com/openchoice](http://www.springeronline.com/openchoice) to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will be published as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

### 3 Editorial procedure

Annals of Hematology is published as a Springer-Online-first publication. Online First articles are published within the Springer online service [springerlink.com](http://springerlink.com) in a temporary directory. For the publication in the printed version, only the final page numbers, the citation line and the online publication date will be added.

Authors should submit their manuscripts to the Editorial Assistant Office online to facilitate even quicker and more efficient processing. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please log directly onto the site

<http://annalsofhematology.manuscriptcentral.com> and upload your manuscript following the on-screen instructions.

Correspondence should be addressed to: Editor-in-Chief, Prof. Dr. A. Ganser, Department of Haematology, Haemostasis and Oncology,

Medizinische Hochschule Hannover  
Carl-Neuberg-Strasse 1, 30625 Hannover, Germany  
e-mail: [ganser.arnold@mh-hannover.de](mailto:ganser.arnold@mh-hannover.de)  
Fax: +49-511 532 8041

Editorial Assistant Office  
Carsten Brall, M.A.  
e-mail: [medi@medi-science.de](mailto:medi@medi-science.de)  
Tel: +49-231-52 13 72, Fax: +49-231-721 3455

Only new, previously unpublished results given in concise form, will be accepted. Known facts should only be briefly mentioned, with appropriate literature citations.

Types of contributions:  
Leading articles, Review articles,  
Original articles (6 printed pages, including figures, tables, and references),  
Rapid communications (2 printed pages),  
Letters to the editors

### 4 Manuscript preparation

All manuscripts are subject to copy editing.

#### Title page

The title page should include:  
- The name(s) of the author(s)  
- A concise and informative title  
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)  
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the communicating author  
- Acknowledgements of funding and grants (if any)

■ An abstract of not more than 250 words should precede the main text.

■ Keywords. Up to seven keywords taken from *Index Medicus* should be supplied after the Abstract for indexing purposes.

■ Abbreviations should be defined at first mention in the abstract and again in the main body of the text and used consistently thereafter.

■ Footnotes to the text should be numbered consecutively and placed at the bottom of the page to which they refer.

■ References  
The list of References should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications should only be mentioned in the text.

Journal titles should be abbreviated according to *Index Medicus*.

Citations in the text should be identified by numbers in square brackets, and the list of references at the end of the paper should be both *alphabetized* under the first author's name and numbered. References by the same author or team of authors should be listed in chronological order.

References with correct punctuation should be styled as follows:

#### Journal article

Bux J, Kissel K, Nowak K, Spengel U, Mueller-Eckhardt C (1991) Autoimmune neutropenia: clinical and laboratory studies in 143 patients. *Ann Hematol* 63:249-252

#### Complete book:

Weismann IL (1985) *Leukemia*. Springer, Berlin Heidelberg New York

#### Chapter of book:

Dahr W, Weber W, Kordowicz M (1981) The allele Su Caucasians-medicolegal, immunochemical and genetic aspects. In: Hummel K, Gerchow J (eds) *Biomathematical evidence of paternity*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 131-138

If available the Digital Object Identifier (DOI) of the cited literature should be added at the end of the reference in question.

### Illustrations and Tables

All figures (photographs, graphs or diagrams) and tables should be cited in the text, and each numbered consecutively throughout. Lowercase letters (a, b etc.) should be used to identify figure parts. If illustrations are supplied with uppercase labeling, lowercase letters will still be used in the figure legends and citations.

Half-tone illustrations (black and white and color). Magnification should be indicated by *scale bars*.

For colour illustrations the authors will be expected to make a contribution (€ 485 or US\$ 534 plus 16% VAT per article) towards the extra costs.

Figure legends must be brief, self-sufficient explanations of the illustrations. The legends should be placed at the end of the text.

Tables should have a title and a legend explaining any abbreviation used in that table. Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

### 5 Proofreading

Authors should make their proof corrections on a printout of the pdf file supplied, checking that the text is complete and that all figures and tables are included. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article. The author is entitled to formal corrections only. Substantial changes in content, e.g. new results, corrected values, title and authorship are not allowed without the approval of the responsible editor. In such a case please contact the appropriate Managing Editor before returning the proofs to the publisher.

### 6 Offprints, Free copy

Two (2) complimentary copies are supplied. Orders for offprints can be placed by returning the order form with the corrected proofs. When you order offprints, you are entitled to receive in addition a pdf file of your article for your own personal use.

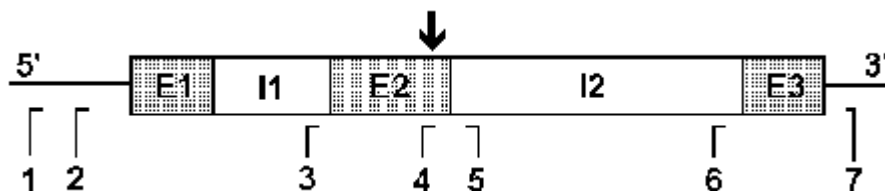
### 7 Usage of Units and Abbreviations

Entity	Abbreviation	SI equivalent
Red blood cell count	RBC	10 <sup>12</sup> /l
White blood cell count	WBC	10 <sup>9</sup> /l
Platelet count		... ×10 <sup>9</sup> /l
Reticulocyte count		% (or ... ×10 <sup>9</sup> /l)
Haemoglobin	Hb	g/dl*
Packed cell volume	PCV	ratio <sup>b</sup>
Mean cell volume	MCV	fl
Mean cell haemoglobin	MCH	pg
Mean cell haemoglobin concentration	MCHC	g/dl
Mean cell diameter	MCD	µm
Sedimentation rate	ESR	mm in 1 hr
Plasma haemoglobin	Plasma Hb	mg/l
Serum vitamin B <sub>12</sub>		ng/l
Serum folate		µg/l
Serum iron		µmol/l
Total iron binding capacity	TIBC	µmol/l
Unsaturated iron binding capacity	UIBC	µmol/l
Transferrin		g/l
Serum haptoglobin		g/l
Plasma fibrinogen		g/l

\* The concentration for Hb only is expressed as *g/dl* and not *g/l* or *g/100 ml*

<sup>b</sup> No unit necessary, *l* is implied

<sup>c</sup> Indicate method only if other than Westergren



b globin gene.

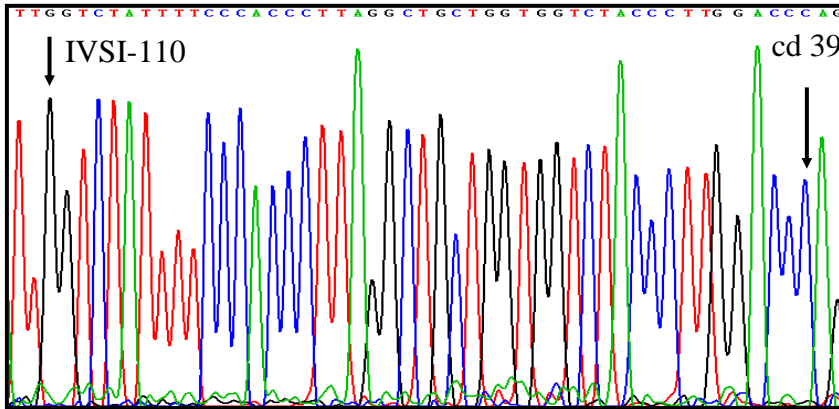
Primers	Sequence 5-3	Direction	Position
1	GCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATC	S	-140
2	TTTGCTTCTGACACAACACTGT	S	+2
3	AGACAGAGAAGACTCTTG	S	+198
4	CTCATGGCAAGAAAGTGCTC	S	+348
5	CCCTTCTTCCTATGACATGAACTTAACCAT	A	+521
6	AATCCAGCTACCATTCTGC	S	+1214
7	TCCAGATGCTCAAGGCCCTTC	A	+1556

S - Sense; A - antisense; Position - position in relation to the Cap site.

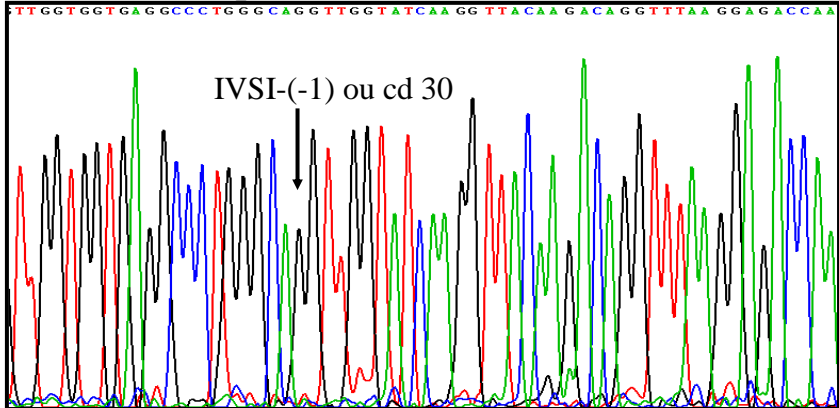
Desenho esquemático do gene da beta globina com a localização dos primers utilizados para o seu seqüenciamento. Adaptado de Miranda, 1997.

Eletroferogramas referentes à casuística estudada.

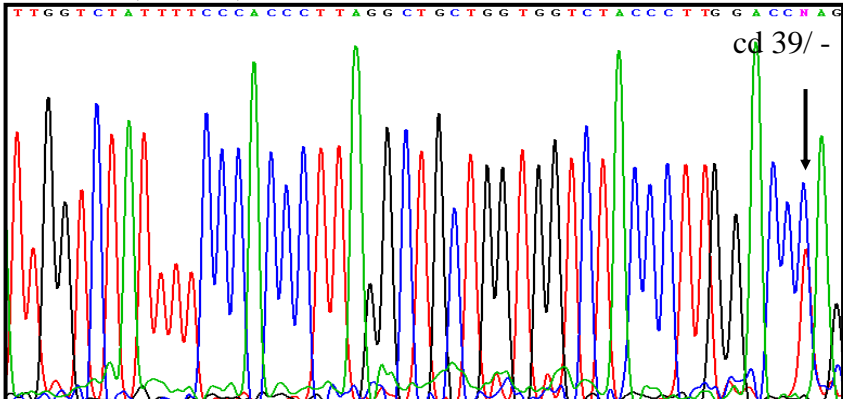
Normal – Sequenciamento Primer Sense  $\beta 1$



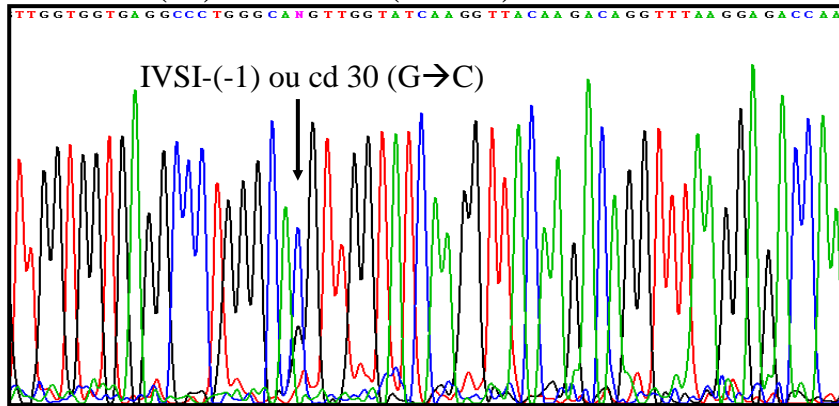
Normal - Sequenciamento Primer Sense  $\beta 1$



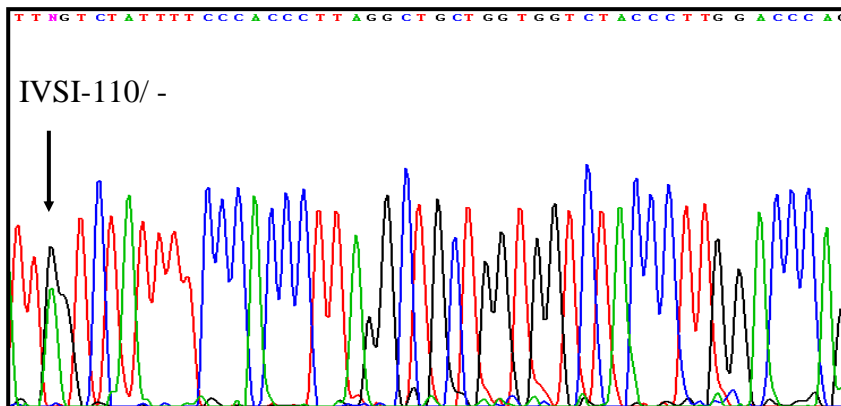
cd 39 (C→T)



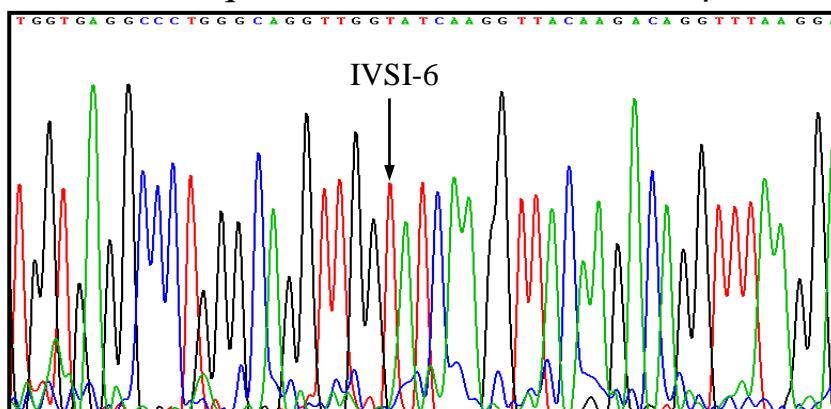
### IVSI – (-1) ou cd 30 (G→C)



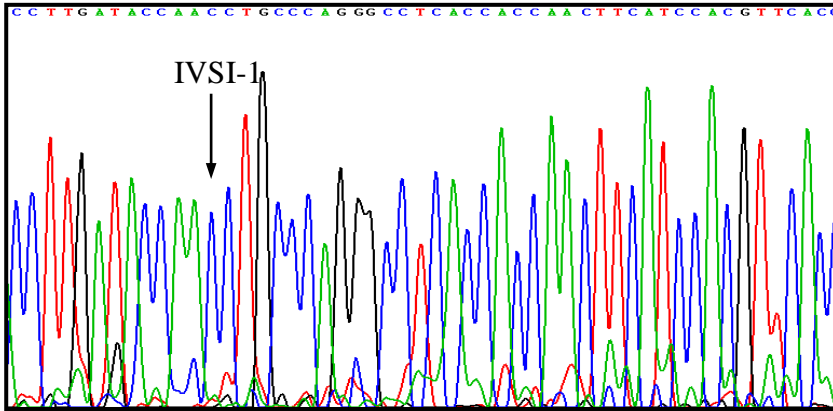
### IVSI-110 (G→A)



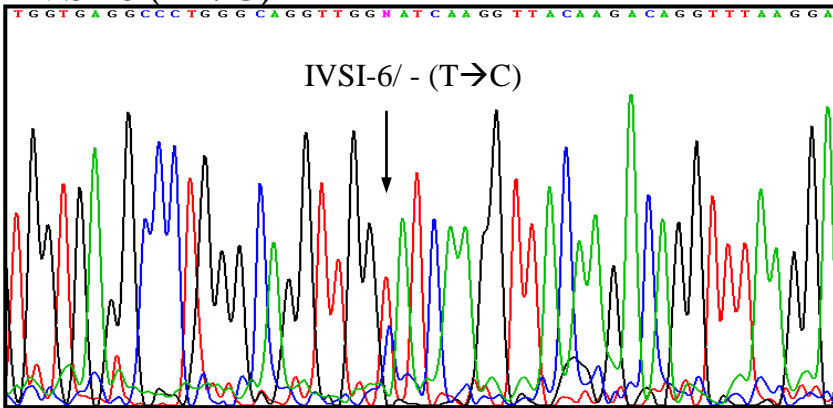
### Normal - Sequenciamento Primer Sense $\beta 1$



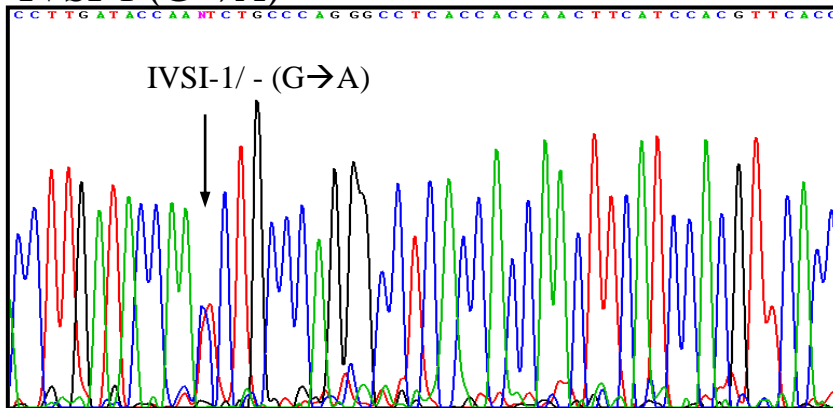
# Normal - Sequenciamento Primer Antisense 1R



# IVSI-6 (T→C)

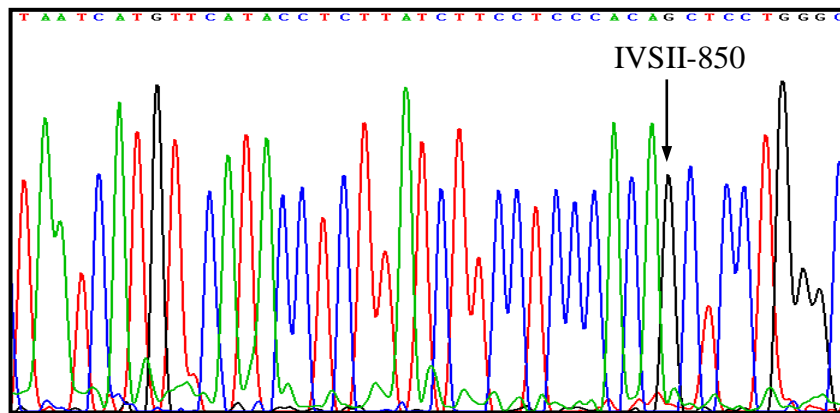


# IVSI-1 (G→A)

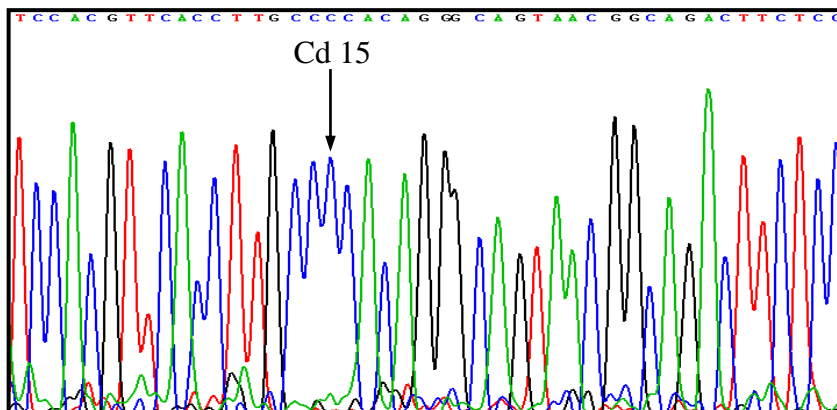




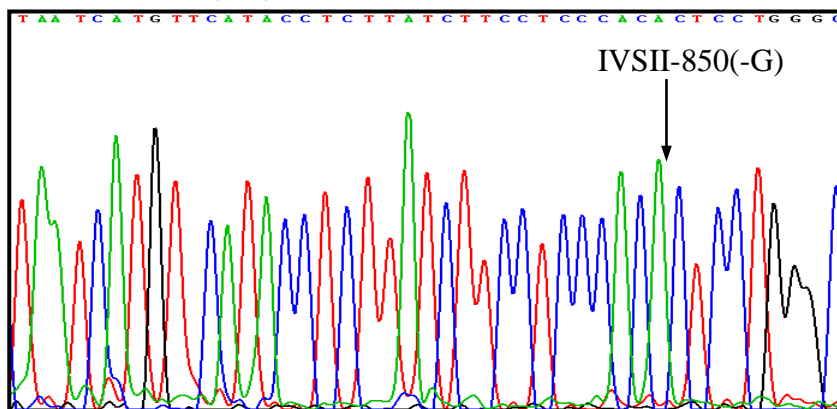
Produto da PCR clonado em pGEM-T easy vector (PROMEGA) e sequenciado com primer Sense



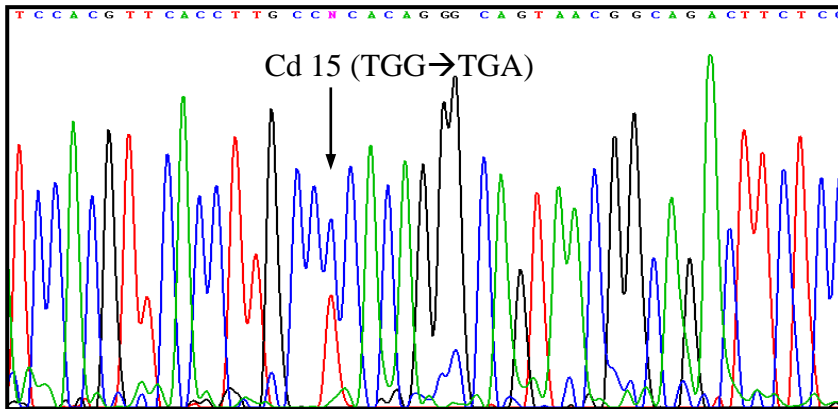
Normal - Sequenciamento Primer Antisense 1R



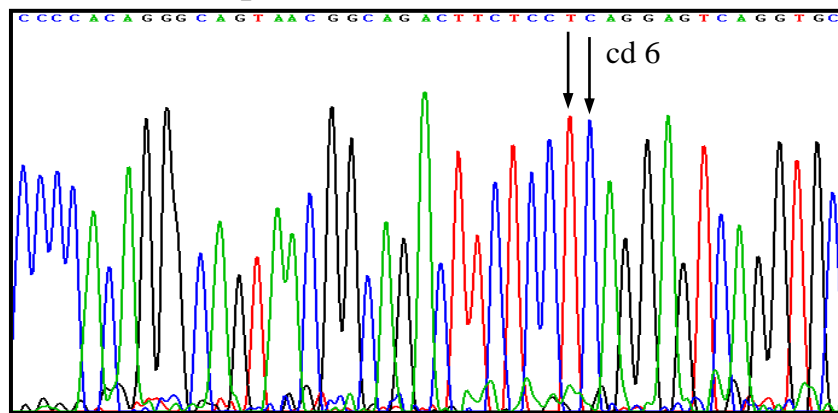
IVSII-850 (-G)



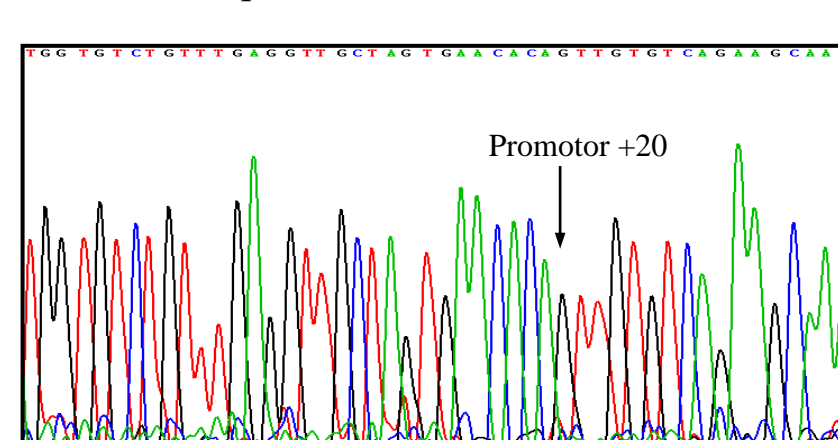
Cd 15 (TGG→TGA) – stop códon



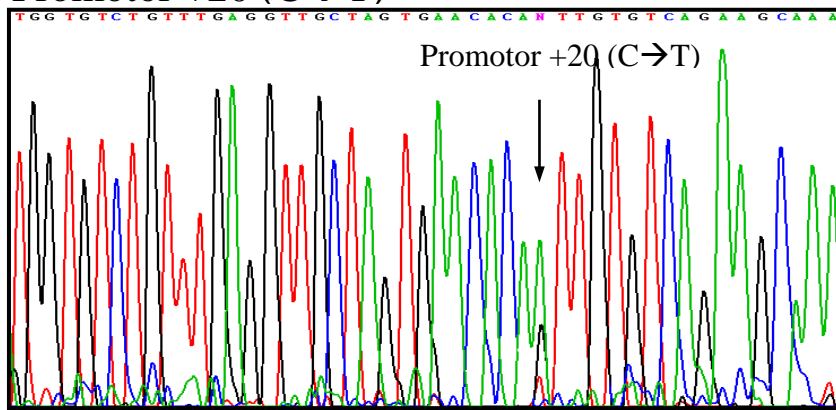
Normal - Sequenciamento Primer Antisense 1R



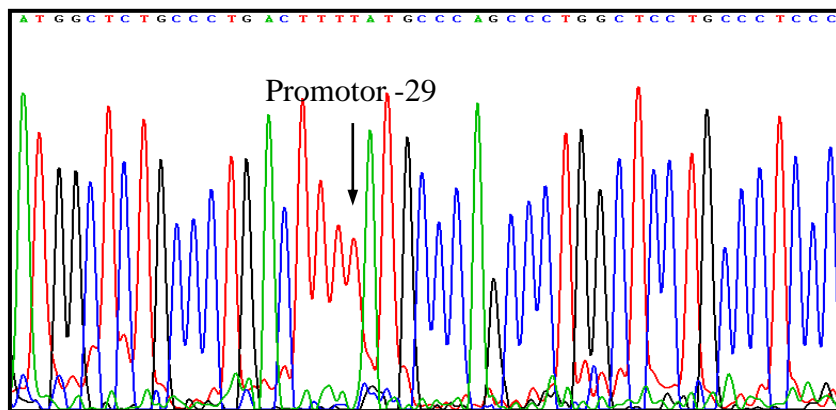
Normal - Sequenciamento Primer Antisense 1R



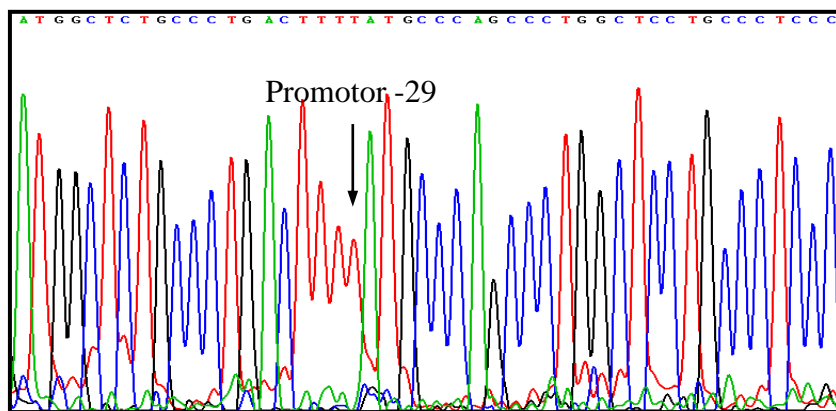
### Promotor +20 (C→T)



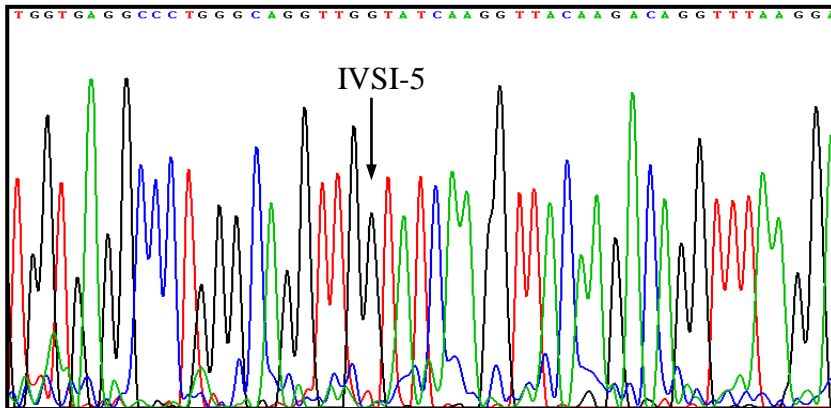
### Normal - Sequenciamento Primer Antisense 1R



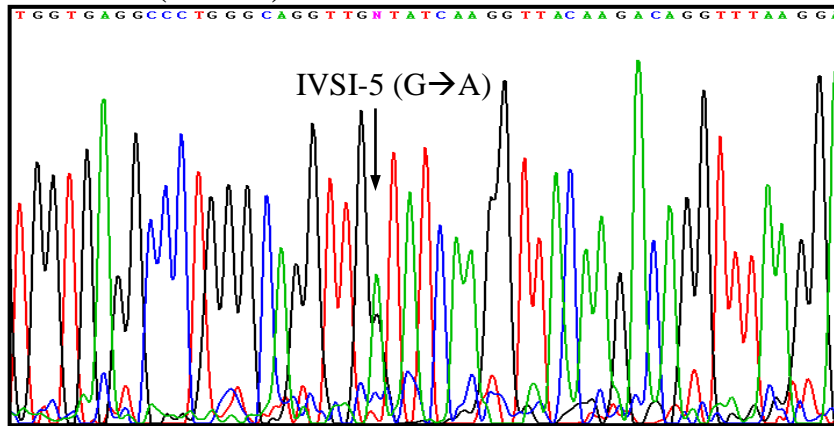
### Normal - Sequenciamento Primer Antisense 1R



## Normal - Sequenciamento Primer Sense $\beta 1$



## IVSI-5 (G→A)



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Número:** \_\_\_\_\_

Prezado Paciente

Existe um tipo de anemia que parece ser comum na nossa população. Tal anemia não traz, para a maioria dos afetados, problema algum, exceto o fato de que desconhecendo a causa, o paciente vai inúmeras vezes ao médico e recebe freqüentemente tratamento com ferro, o que é prejudicial para a sua saúde.

As talassemias beta são um grupo de alterações hereditárias, ou seja, que passam de pais para filhos e que podem levar a quadros variáveis de anemia. Na maioria dos casos, essa anemia é tão leve que o paciente não sente nada, mas em outros pode apresentar sintomas como fraqueza, falta de ar, sonolência e desânimo e, com o passar do tempo, o paciente pode desenvolver pedra na vesícula (litíase biliar).

Este projeto de pesquisa, para o qual estamos pedindo a sua participação, tem como objetivo principal levantar dados mais precisos e atuais sobre o número de pessoas afetadas pela beta talassemia e saber se isto vem acompanhado ou não de outra doença, que é a deficiência de G6PD, uma enzima que, quando existe em quantidade insuficiente no organismo, também pode causar anemia, além de icterícia nos bebês recém-nascidos e outros problemas. Com as informações obtidas, poderemos planejar programas que oferecem uma melhor qualidade de atendimento, diagnóstico e orientação aos pacientes, principalmente sobre a possibilidade de casais portadores de talassemia beta e/ou deficiência de G6PD gerarem filhos também afetados.

Para o desenvolvimento deste trabalho, precisamos de um grupo de pessoas portadoras de anemia a esclarecer.

É necessário apenas que os participantes do estudo com anemia em investigação colem uma amostra de sangue (5 ml), que será realizada por profissional habilitado e com todas as técnicas adequadas.

Estas amostras de sangue serão analisadas para que sejam identificados possíveis portadores de talassemia beta e deficiência de G6PD. Também será extraído

DNA desta amostra de sangue, que é o material genético que pode auxiliar no esclarecimento do diagnóstico.

Os riscos associados ao presente estudo são apenas os de uma coleta de sangue venoso. Pode haver um pequeno hematoma, isto é, um pequeno derramamento de sangue no local da coleta. Lembramos que todo material utilizado é descartável e estéril e o profissional que irá realizar a coleta está capacitado para esta função.

Os benefícios envolvidos são os de possibilitar o diagnóstico de uma doença genética e oferecer alternativas de tratamento e de aconselhamento familiar com finalidade de reprodução.

Todos os resultados obtidos serão reencaminhados para o seu médico, o qual ficará responsável pelo aconselhamento e acompanhamento do paciente.

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado do objetivo deste trabalho de forma clara e detalhada, bem como sobre o procedimento no qual estarei envolvido, dos desconfortos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Além disso, sei que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e terei a liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, se assim o desejar, sem prejuízo para o meu tratamento.

O (a) profissional \_\_\_\_\_ certificou-me de que todas as informações por mim fornecidas serão utilizadas apenas para fins do presente projeto de pesquisa e serão divulgadas de forma anônima.

\_\_\_\_\_

Paciente

\_\_\_\_\_

Pesquisador

Data: \_\_\_\_\_

Responsável: Dra Sandra Leistner

Telefone para esclarecimentos: 33168133



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**  
**Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação**

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

**RESOLUÇÃO**

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 03-082

**Versão do Projeto:** 13/03/2003

**Versão do TCLE:** 02/07/2003


**Pesquisadores:**

SANDRA LEISTNER SEGAL  
VIVIAN CAROLINE DADALT  
SIMONE MARTINS DE CASTRO  
SANDRINE COMPARSI WAGNER  
CLAUDIA REGINA BONINI DOMINGOS  
JULIO ROBERTO DIEHL  
FLAVO BENO FERNANDES

**Título:** CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DOS INTERFERENTES NA EXPRESSÃO FENOTÍPICA DE TALASSEMIAS NA POPULAÇÃO DO RIO GRANDE DO SUL

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

Porto Alegre, 04 de julho de 2003.

  
Profa. Themis Reverbil da Silveira  
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA