

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Instituto de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**BASES MOLECULARES DAS HEMOGLOBINAS VARIANTES E  
TALASSEMIAS NO RIO GRANDE DO SUL**

**Sandrine Comparsi Wagner**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

**Orientadora: Profa. Dra. Mara H. Hutz**

Porto Alegre, março de 2010

## **Instituições e Fontes Financiadoras**

---

As pesquisas realizadas nos laboratórios de Hemoglobinas, da Faculdade de Farmácia, e de DNA e de Eletroforese, do Departamento de Genética, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), bem como no Centro de Referência em Hemoglobinopatias do reino Unido, em Oxford, foram subvencionadas pelas agências Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Instituto do Milênio, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX) e pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS.

## **Agradecimentos**

---

Ao longo de minha vida tenho visto e aprendido diversas coisas. Uma delas é que não existe a realização de algo, qualquer projeto ou sonho, sozinho. Existem muitas personagens, pessoas que fazem parte da minha vida, em especial, da minha família, meus amigos e colegas de trabalho que estiveram envolvidos desde a minha graduação, mestrado e, agora, o doutorado. Alguns merecem um destaque, uma lembrança em especial, e a eles me refiro a seguir.

À Profa. Dra. Mara. H. Hutz, minha orientadora, que não hesitou em aceitar este projeto, investindo tempo, conhecimento, experiência, carinho e dedicação na sua execução. A ela, todo meu reconhecimento e gratidão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, bem como seu corpo docente, funcionários e colegas, pelo auxílio e desenvolvimento que contribuíram para a concretização deste projeto.

À Profa. Simone Martins Castro, pelo estímulo, apoio, valiosos conselhos e preciosas sugestões.

À Ana Santin, Laura Cardoso e Carina Zaleski, da Faculdade de Farmácia da UFRGS, pelo auxílio na organização e preparo das amostras.

À Tatiana González, uma verdadeira perita no mundo da biologia molecular, por seu carinho, disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos e competência no auxílio da realização das técnicas.

À Janaína Jaeger, por ter me acompanhado em um momento muito difícil.

Ao Prof. Dr. José Artur Bogo Chies, pelo auxílio nas questões bioéticas implicadas neste projeto.

À Dra. Sídia Maria Callegari-Jacques, pelo “valioso auxílio nos temas dedicados à estatística”.

Às colegas das salas 113 e 117 pela companhia, em especial à Luciana Rodrigues, minha grande parceira de sala.

Ao Elmo Cardoso e à Ellen Mezzeck, do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelos valiosos serviços prestados, pelo estímulo e dedicação.

Aos amigos da Feevale, Eloir, Fabiana, Fairus, Helena, Isabel, Karen, Rejane, Renato, Simone e Tiago, pela amizade e auxílio em diversos momentos.

À monitora da Feevale, Nicole Pezzi, por todo o apoio na organização das aulas práticas e pela sua capacidade de “ler meus pensamentos” nos momentos em que eu mais precisava.

À Cyntia, Gisele e Vanessa, incomparáveis colegas de faculdade que se tornaram minhas eternas amigas, pelas longas conversas e momentos de descontração.

À Dra. Shirley Henderson e ao Dr. John Old, do Centro Nacional de Referência em Hemoglobinopatias do Reino Unido, em Oxford, por terem me acolhido e auxiliado na execução dos sequenciamentos.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos - Nestor, Lourdes, Simone, Marco e Marcius, por terem acreditado em mim e pelas constantes palavras de apoio e estímulo.

À Família Paim, hoje minha família também, por todo o apoio, carinho e amor.

Ao Fábio, pela presença constante em todos os momentos da minha vida, por seu carinho, amor e compreensão

## Sumário

---

<b>Resumo.....</b>	<b>9</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>11</b>
<b>I Introdução.....</b>	<b>13</b>
I. 1 A molécula de hemoglobina: síntese e ontogenia das cadeias globínicas.....	14
I. 2 Distúrbios hereditários que afetam a estrutura e a síntese da hemoglobina.....	16
I. 2.1 Hemoglobinopatias estruturais .....	17
I. 2.1.1 Hemoglobina S .....	17
I. 2.1.2 Hemoglobina C.....	18
I. 2.2 Talassemias.....	19
I. 2.2.1 Talassemias alfa.....	20
I. 2.2.2 Talassemias beta.....	22
I. 3 Modificadores genéticos das hemoglobinopatias.....	23
I. 4 Distribuição geográfica das hemoglobinopatias e talassemias.....	24
I. 4.1 Distribuição geográfica das hemoglobinopatias e talassemias no Brasil .....	27
I. 4.2 Distribuição geográfica das hemoglobinopatias e talassemias no Rio Grande do Sul .....	29
I. 5 Triagem neonatal .....	30
I. 5.1 Triagem neonatal no Brasil .....	34
I. 6 Justificativa e Objetivos .....	36
I. 7 Aspectos éticos e de biossegurança.....	37
<b>II Neonatal screening for haemoglobinopathies: the results of a public health system in south Brazil.....</b>	<b>38</b>
<b>III High prevalence of Hb E-Saskatoon in Brazilians.....</b>	<b>52</b>
<b>IV Prevalence of <math>\alpha</math>-thalassemia in south Brazil: importance to microcytic anemia diagnosis.....</b>	<b>62</b>

<b>V <math>\beta^S</math> globin gene haplotypes and <math>\alpha</math> thalassemia in sickle cell patients from Rio Grande do Sul, Brazil .....</b>	<b>77</b>
<b>VI Discussão .....</b>	<b>90</b>
<b>VII Perspectivas .....</b>	<b>96</b>
<b>VIII Referências Bibliográficas .....</b>	<b>99</b>
<b>IX Anexos.....</b>	<b>110</b>
Anexo I Termo de Consentimento Livre Esclarecido .....	111
Anexo II Association of Hb Shelby with Hb S in the south of Brazil.....	113

## **Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades**

---

$\alpha$  - Alfa

$\alpha^+$  - Alfa mais

$\alpha^0$  - Alfa zero

**AF** - Anemia falciforme

$\beta$  - Beta

$\beta^A$  - Alelo beta normal

$\beta^S$  - Alelo beta S

$\beta^+$  - Beta mais

$\beta^0$  - Beta zero

**$\beta$  tal** - Talassemia beta

**CO<sub>2</sub>** - Dióxido de carbono

$\delta$  - Delta

**DNA** - Ácido desoxirribonucléico

$\epsilon$  -Épsilon

**FIE** - Focalização isoelétrica

$\gamma$  - Gama

**Hb** - Hemoglobina

**Hb A** - Hemoglobina A

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

**Hb AC** - Heterozigoto: Hemoglobinas A e C

**Hb AS** - Heterozigoto: Hemoglobinas A e S

**Hb Bart's** - Hemoglobina Bart's

**Hb C** - Hemoglobina C

**Hb Constant Spring** - Hemoglobina Constant Spring

**Hb E** - Hemoglobina E

**Hb F** - Hemoglobina fetal

**Hb Gower I** - Hemoglobina Gower I

**Hb Gower II** - Hemoglobina Gower II

**Hb H** - Hemoglobina H

**Hb Portland** - Hemoglobina Portland

**Hb S** - Hemoglobina S

**Hb S/tal  $\beta^+$**  - Hemoglobina S/ Talassemia beta mais

**Hb S/tal  $\beta^0$**  - Hemoglobina S/ Talassemia beta zero

**HCPA** - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**HPLC** - *High pressure liquid chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)

**HS-40** - *Hipersensitive site*

**IVS** - Íntron

**LCR** - *Locus control region*

**MCS** - *Multispecies conserved sequences*

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**O<sub>2</sub>** - Oxigênio

**$\psi$**  - Pseudo

**PHHF** - Persistência hereditária de hemoglobina fetal

**RNA** - Ácido ribonucléico

**SNPs** - *Single nucleotides polymorphisms*

**UGT1A1** - Gene da uridina difosfato glucoronil transferase

**$\zeta$**  - Zeta



## Resumo

---

Hemoglobinopatias são alterações nos genes das globinas que determinam hemoglobinas variantes e/ou talassemias, com manifestações clínicas variáveis em seus portadores. Estudos realizados no Brasil mostram alta prevalência de heterozigotos para Hb S e Hb C, além das talassemias  $\alpha$  e  $\beta$ . Considerando-se essa alta frequência populacional e a constituição étnica do sul do país, este trabalho teve como objetivo determinar as bases moleculares das hemoglobinas variantes e talassemias no Rio Grande do Sul.

Fizeram parte deste estudo amostras de sangue de recém-nascidos triados pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), pacientes encaminhados por médicos e serviços de saúde do Estado para investigação de anemia microcítica a esclarecer, pacientes com anemia falciforme e controles afro e eurodescendentes.

A identificação e quantificação das frações hemoglobínicas foram realizadas por focalização isoelétrica (FIE) e/ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As principais deleções responsáveis pela talassemia  $\alpha$  e os haplótipos do gene  $\beta$  da globina foram determinados por técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR). Quando necessário, foram realizados sequenciamentos dos genes  $\alpha$  e  $\beta$  da globina.

Dentre as 437.787 amostras de recém-nascidos analisadas, 6.391 (1,46%) apresentaram padrão hemoglobínico alterado: 5.236 FAS, 837 FAC, 199 FAD, 33 FS, 7 FSC, 1 FSD, 7 FS/talassemia  $\beta$ . A incidência das síndromes falciformes foi 1:9.100 nascimentos. Além desses, foram identificados 71 heterozigotos para variantes raras, nos quais foram observadas 26 variantes de cadeia  $\alpha$  (3 Hb Woodville, 1 Hb Chad, 2 Hb Hasharon, 4 Hb G-Phil, 4 Hb G-Pest e 12 Hb Stanleyville) e 21 de cadeia  $\beta$  (11 Hb E-Saskatoon, 1 Hb Osu-Christianborg, 1 Hb Richmond, 2 Hb O-Arab, 1 Hb D Los Angeles, 1 Hb J-Guantanamo, 1 Hb Shelby, 1 Hb Beckman, e 2 Hb Hope). Dentre essas hemoglobinas, 70% estão sendo identificadas pela primeira vez no Brasil, incluindo os 11 casos de Hb E-Saskatoon. A fim de esclarecer esse achado, foram investigados os perfis eletroforéticos e cromatográficos, além da origem genética dos indivíduos portadores dessa hemoglobina através de um estudo de miscigenação e da determinação dos haplótipos do gene de cadeia  $\beta$ . O padrão de migração da FIE foi semelhante ao da Hb E (PI entre 7,59 e 7,65) e o tempo de eluição na HPLC foi na janela da Hb S (4,26-4,38 min). O estudo de miscigenação mostrou uma alta taxa de contribuição européia

(>80%) nesses indivíduos. O haplótipo 2 (+----) foi identificado em todos os portadores de Hb E-Saskatoon. Estes dados sugerem uma origem para esta hemoglobina, diferente da descrita na Turquia, na qual o haplótipo 6 (-++++) foi observado. Especula-se que esta hemoglobina tenha sido introduzida no Rio Grande do Sul através dos colonizadores da Península Ibérica, uma vez que ela já foi descrita em espanhóis. Do ponto de vista laboratorial, acredita-se que a Hb E-Saskatoon esteja sendo erroneamente diagnosticada, uma vez que a maioria dos laboratórios de triagem neonatal no país aplica apenas uma metodologia (FIE ou HPLC). Em uma população heterogênea do ponto de vista genético, como é a brasileira, sugere-se o uso de ambas as metodologias, além de técnicas de biologia molecular, para a confirmação das hemoglobinas variantes raras.

A talassemia  $\alpha$  foi investigada em 493 indivíduos não relacionados (202 e 191 controles euro e afrodescendentes, respectivamente) e 101 pacientes com anemia microcítica a esclarecer, com perfil hemoglobínico normal. Apenas a deleção  $-\alpha^{3,7}$  foi observada, com frequências alélicas de 0,02 e 0,12 entre euro e afrodescendentes e 0,20 em pacientes com anemia a esclarecer. Esses resultados sugerem que a talassemia  $\alpha$ , representada pela deleção  $-\alpha^{3,7}$  é uma causa importante de microcitose nas anemias no Sul do Brasil, independente do grupo étnico ( $p=0,001$ ).

Com relação aos haplótipos do gene HBB\*S, o haplótipo Bantu foi o mais frequente (67.3%; IC 95%: 60.9 – 73.2), seguido dos haplótipos Benin (25.0%; IC 95%: 19.6- 31.0), Camarões (0.9%; IC 95%: 0.2 – 3.0) e Senegal (0.5%; IC 95%: 0.0- 2.2). O haplótipo Saudi não foi encontrado na amostra. Além desses, 14 cromossomos foram classificados como atípicos. A talassemia alfa foi investigada, sendo que a deleção  $-\alpha^{3,7}$  (única observada) apresentou uma frequência alélica de 0,14. Esses dados mostram não haver aumento dessa deleção em indivíduos homocigotos para Hb S, uma vez que não diferem da frequência encontrada em indivíduos sadios de mesmo grupo étnico (0,12). Com relação aos haplótipos, os dados estão de acordo com os observados nas demais regiões do país, nas quais o haplótipo Bantu é o mais frequente.

## Abstract

---

Hemoglobinopathies are genetic globin gene disorders, characterized by the presence of a variant hemoglobin and/or thalassemia that show a wide range of clinical manifestations. Studies performed in Brazil show high prevalence of Hb S and Hb C heterozygotes as well as  $\alpha$  and  $\beta$  thalassemias. Considering the population prevalence and the ethnic constitution of the South Brazilian region, this study aimed to determine the molecular basis of the variant hemoglobins and thalassemia in Rio Grande do Sul.

The analyses included blood samples from neonates selected by the Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), patients under investigation of microcytic anemia, sickle cell anemia patients and control groups of African and European descent.

The identification and quantification of hemoglobin were performed using isoelectric focusing (IEF) and/or cation exchange high performance liquid chromatography (HPLC). The most common deletions resulting in  $\alpha$  thalassemia and the haplotypes for  $\beta$  globin gene were determined by PCR based methods. When necessary, sequencing was performed for  $\alpha$  and  $\beta$  globin genes.

Among the 437,787 neonates samples analyzed, 6,391 (1.46%) presented an abnormal hemoglobin pattern: 5,236 FAS, 837 FAC, 199 FAD, 33 FS, 7 FSC, 1 FSD, 7 FS/ $\beta$  thalassemia. Incidence of sickle cell disease was 1:9,100 births. Furthermore, 71 individuals heterozygous for rare variants were observed: 26  $\alpha$  chain variants (3 Hb Woodville, 1 Hb Chad, 2 Hb Hasharon, 4 Hb G-Phil, 4 Hb G-Pest, and 12 Hb Stanleyville) and 21  $\beta$  chain variants (11 Hb E-Saskatoon, 1 Hb Osu-Christianborg, 1 Hb Richmond, 2 Hb O-Arab, 1 Hb D Los Angeles, 1 Hb J-Guantanamo, 1 Hb Shelby, 1 Hb Beckman, and 2 Hb Hope). Seventy per cent of these rare hemoglobins were identified for the first time in Brazil, including 11 individuals heterozygous for Hb E-Saskatoon. In order to further analyze this data, electrophoretic and chromatographic profiles were investigated, as well as the genetic origin of the carriers of this hemoglobin, through an admixture study and  $\beta$ -globin haplotype determination. The FIE migration pattern was similar to Hb E (PI between 7.59 and 7.65) and the elution pattern in HPLC was in the Hb S window (4.26-4.38 min). The admixture study indicated a high European contribution (>80%) in these individuals. Haplotype 2 (+----) was identified in all Hb E-Saskatoon carriers. These data suggest a origin for this hemoglobin, distinct from that described in Turkey, where haplotype 6 (-+++ ) was observed. It can be speculated that

this hemoglobin was brought to Rio Grande do Sul by immigrants from Iberian Peninsula, since it has been described in Spaniards. We believe that Hb E-Saskatoon has been erroneously diagnosed, because most neonatal laboratories use only one methodology (FIE or HPLC). In a genetic heterogeneous population, as Brazilians, we suggest the use of both methodologies, together with molecular techniques to a precise identification of hemoglobin variants.

$\alpha$  thalassemia was investigated in 493 unrelated individuals (202 and 191 European and African descendants, respectively) and in 101 patients with microcytic anemia with normal Hb profile. Only  $-\alpha^{3,7}$  deletion was observed, presenting allelic frequencies of 0.02 and 0.12, respectively, in European and African descendants and of 0.20 in patients with microcytic anemia. These results suggest that  $\alpha$  thalassemia, represented here by  $-\alpha^{3,7}$  deletion, is an important cause for microcytosis in South Brazil, independently of ethnic origin ( $p=0.001$ ).

With regard to HBB\*S haplotypes, Bantu haplotype was the most frequent (67.3%; CI 95%: 60.9 – 73.2), followed by Benin (25.0%; CI 95%: 19.6- 31.0), Camaroon (0.9%; CI 95%: 0.2 – 3.0) and Senegal haplotypes (0.5%; CI 95%: 0.0- 2.2). The Saudi haplotype was not observed in this sample. Fourteen chromosomes classified as atypical were observed.  $\alpha$  thalassemia was also investigated and the  $-\alpha^{3,7}$  deletion was the only  $\alpha$ -thalassemia determinant observed. The frequency of this allele was estimated as 0.14. These data indicate that the frequency of this deletion in homozygous Hb S individuals is not different from that observed in the control group with the same ethnic origin (0.12). The data concur with previously published data from Brazilian regions. The Bantu haplotype is the most common in all Brazilian regions.



## I. 1 A molécula de hemoglobina: síntese e ontogenia das cadeias globínicas

No sistema circulatório, os eritrócitos ou células vermelhas são responsáveis pelo transporte de oxigênio ( $O_2$ ) aos tecidos e dióxido de carbono ( $CO_2$ ) aos pulmões, para sua eliminação. Dentro dos eritrócitos, esse processo é mediado pela hemoglobina (Hb), uma proteína tetramérica composta por duas cadeias do tipo  $\alpha$  ( $\alpha$  ou  $\zeta$ ) e duas cadeias do tipo  $\beta$  ( $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  ou  $\epsilon$ ). Em 1866, Körben observou que a hemoglobina de recém-nascidos era fortemente resistente à desnaturação alcalina, em contraste com o comportamento da hemoglobina adulta. Hoje, sabe-se que existe considerável heterogeneidade na hemoglobina humana em todos os estágios de desenvolvimento (Harju, McQueen et al., 2002).

A síntese das cadeias globínicas sofre alterações durante a vida pré-natal e pós-natal, adequando-se ao constante desenvolvimento do embrião e do feto sob um rigoroso controle genético (Higgs, Vickers et al., 1989). Isso tem reflexo na síntese de diferentes hemoglobinas em cada estágio do desenvolvimento. Todas as hemoglobinas apresentam a mesma estrutura tetramérica, mas com diferentes pares de cadeias globínicas, cada uma ligada a uma molécula heme. As hemoglobinas adultas e fetal apresentam as cadeias  $\alpha$  ligadas a cadeias  $\beta$  (Hb A;  $\alpha_2\beta_2$ ), cadeias  $\delta$  (Hb A<sub>2</sub>;  $\alpha_2\delta_2$ ) e cadeias  $\gamma$  (Hb F;  $\alpha_2\gamma_2$ ). No período embrionário, as cadeias  $\zeta$  combinam-se com as cadeias  $\gamma$  para produzir Hb Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ) ou com cadeias  $\epsilon$  para produzir Hb Gower 1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), ao passo que cadeias  $\alpha$  e  $\epsilon$  formam a Hb Gower 2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) (Higgs and Weatherall, 2009). A Figura 1 apresenta a ontogenia da síntese das cadeias globínicas. Como pode ser observado nessa figura, as cadeias globínicas  $\alpha$  são necessárias para a síntese de hemoglobinas presentes na fase fetal e na fase adulta, exercendo importante papel na manutenção da estabilidade destas moléculas. Logo, defeitos que interferem na sua síntese têm repercussão clínica em ambas as fases do desenvolvimento, diferente das cadeias  $\beta$ , que estão presentes apenas no componente hemoglobínico adulto maior, a Hb A (Waye and Chui, 2001).

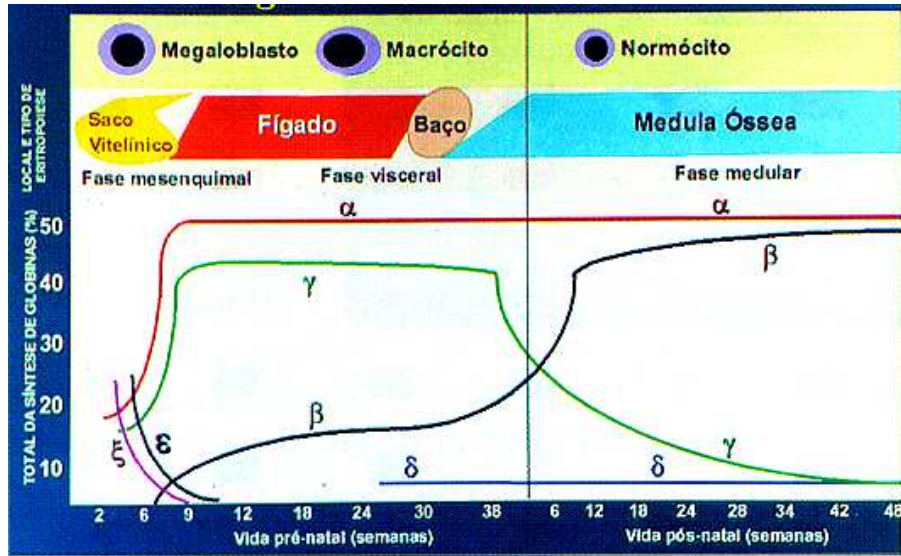


Figura 1. Ontogenia das cadeias globínicas. Adaptado de Weatherall and Clegg, 1981;

Os genes que codificam as cadeias globínicas já foram totalmente identificados e encontram-se organizados em dois agrupamentos gênicos separados (Figura 2). No braço curto do cromossomo 16, entre a banda p13.2 e o telômero, situa-se o complexo gênico das globinas tipo  $\alpha$ , que compreende um gene para a cadeia polipeptídica embrionária  $\zeta$ , quatro pseudogenes ( $\psi\zeta 1$ ,  $\psi\alpha 1$ ,  $\psi\alpha 2$  e  $\theta 1$ ) e dois genes que codificam o mesmo polipeptídeo  $\alpha$  ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ). Esse agrupamento engloba uma extensão de aproximadamente 30.000 pares de bases nitrogenadas (30 Kb). A 5' desse agrupamento, existem quatro sequências não-codificadoras altamente conservadas (*multispecies conserved sequences –MCS*), denominadas de MCS-R1 –R4. Acredita-se que essas sequências estejam envolvidas na regulação dos genes  $\alpha$  (Higgs and Weatherall, 2009), e que o MSC-R2 (também denominado HS-40) seja essencial para a expressão dos genes dessas cadeias (Higgs, Sharpe et al., 1998; Wallace, Marques-Kranc et al., 2007).

Na porção terminal do braço curto do cromossomo 11, em uma região com aproximadamente 70 Kb, situa-se o agrupamento gênico das globinas tipo  $\beta$ , que inclui os genes que codificam as cadeias  $\epsilon$  (embrionária), os dois genes que codificam as cadeias  $\gamma$  ( $^G\gamma$  e  $^A\gamma$ ) (fetal), um pseudogene ( $\psi\beta$ ), um gene para cadeia  $\delta$  e um gene para cadeia  $\beta$  (Higgs, Vickers et al., 1989) (Figura 2). A 5' desse agrupamento, encontra-se uma região controladora (*locus control region-LCR*). Essa região consiste de cinco sítios hipersensíveis (HS) à DNaseI (Harju, Navas et al., 2005) e é essencial para a

expressão de todos os genes do complexo (Thein, 2005). Nos dois agrupamentos, os genes encontram-se dispostos, em ambos os cromossomos, na mesma ordem na qual eles são expressos durante o desenvolvimento.

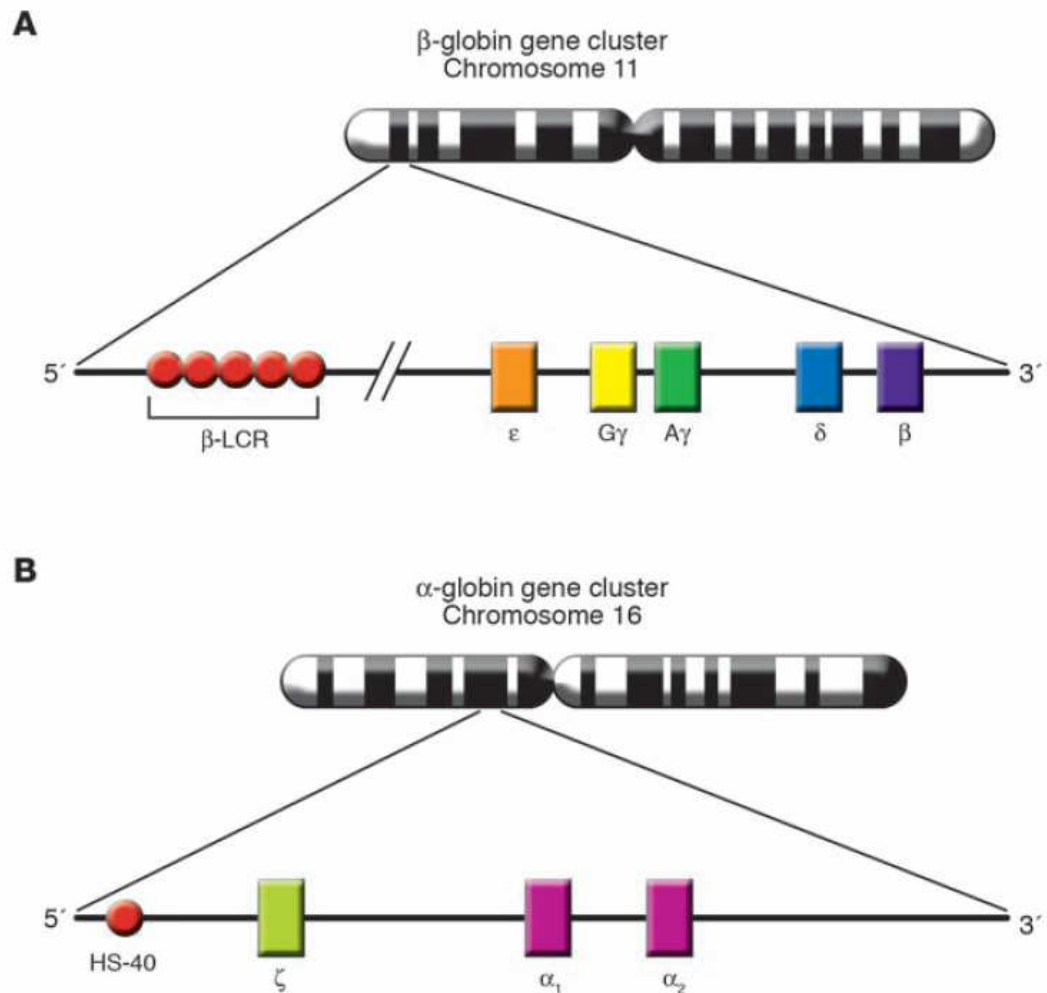


Figura 2. Localização do agrupamento gênico das cadeias globínicas tipo  $\beta$  no cromossomo 11 e das cadeias globínicas tipo  $\alpha$  no cromossomo 16. Adaptado de (Frenette and Atweh, 2007).

## I. 2 Alterações hereditárias que afetam a estrutura e a síntese da hemoglobina

As alterações que afetam a estrutura e a síntese da hemoglobina podem ser divididas em dois grandes grupos: as caracterizadas por variantes de hemoglobina estruturalmente anormais e aquelas nas quais uma ou mais cadeias globínicas são sintetizadas a uma taxa reduzida. O primeiro grupo é chamado de hemoglobinopatias



estruturais e o segundo, de talassemias. Um terceiro grupo consiste na herança de ambas as mutações (uma estrutural e outra qualitativa). Além desses, existe um quarto grupo, caracterizado pela síntese aumentada de hemoglobina fetal na vida adulta, chamado de persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF) (Weatherall and Clegg, 1981).

### **I. 2.1 Hemoglobinopatias estruturais**

Nas hemoglobinopatias estruturais são observadas alterações na composição da fração globínica da hemoglobina. Esse defeito pode estar localizado em um ou mais tipos de cadeias polipeptídicas. Logo, representam um conjunto de hemoglobinas variantes, que diferem das hemoglobinas normais não apenas pela sua composição, mas, sobretudo, pelas suas propriedades físico-químicas. Atualmente, mais de 1.000 hemoglobinas variantes já foram descritas, sendo que mais de 75 % delas ocorrem pela substituição de um único aminoácido na cadeia polipeptídica (Giardine, van Baal et al., 2007). Outras alterações existentes são devidas à produção de cadeias globínicas híbridas, deleções ou inserções de aminoácidos ou cadeias com duas substituições de aminoácidos (Weatherall and Clegg, 1999).

As hemoglobinas variantes resultam de diferentes mecanismos moleculares, tais como mutações de ponto, inserções/deleções de nucleotídeos, ocasionando a substituição de aminoácidos, aumento ou diminuição das cadeias globínicas e *crossing over* desigual, levando à fusão de hemoglobinas. A maioria das hemoglobinas variantes é clínica e hematologicamente silenciosa. Entretanto, muitas delas afetam a função da hemoglobina, e diferentes efeitos são observados, tais como afoçamento, instabilidade, diminuição ou aumento da afinidade ao oxigênio e diminuição de síntese, levando a quadros hemolíticos, policitêmicos, entre outros (Giardine, van Baal et al., 2007). As hemoglobinas variantes mais prevalentes e clinicamente significativas são as Hb S e Hb C, que serão apresentadas a seguir.

#### **I. 2.1.1 Hemoglobina S (Hb S)**

A Hb S difere da Hb A pela substituição do ácido glutâmico pela valina na sexta posição da cadeia  $\beta$ . As síndromes falciformes incluem a homozigose para Hb S (Hb SS), além da heterozigose para a Hb S em combinação com outras hemoglobinas variantes ou talassemias. Os genótipos mais frequentes associados à Hb S, bem como os graus de manifestações clínicas, estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Lista das síndromes falciformes, dos genótipos associados e graus de manifestações clínicas.

<b>Genótipo</b>	<b>Genes</b>	<b>Manifestações Clínicas</b>
Hb AS	$\beta^A \beta^S$	Ausente
Hb SS	$\beta^S \beta^S$	Grave
Hb SC	$\beta^S \beta^C$	Leve
Hb S/tal $\beta^0$	$\beta^S \beta^0$ talassemia	Grave
Hb S/tal $\beta^+$	$\beta^S \beta^+$ talassemia	Moderada ou leve (dependendo da mutação da talassemia)

Adaptado de Frenette and Atweh (2007)

Os indivíduos heterozigotos apresentam um gene para cadeia  $\beta$  normal ( $\beta^A$ ) e um gene para cadeia  $\beta$  S ( $\beta^S$ ) e produzem em torno de 60% de Hb A e 40% de Hb S. Já os indivíduos homozigotos, ou portadores de anemia falciforme, produzem principalmente Hb S e quantidades variáveis de Hb F.

A mutação que determina a síntese da Hb S é responsável por inúmeras alterações fisiopatológicas e físico-químicas na molécula de hemoglobina quando em baixa tensão  $O_2$  (Mackie and Hochmuth, 1990). Quando a Hb S é desoxigenada ocorre uma interação hidrofóbica com outras moléculas de hemoglobina, desencadeando uma agregação em grandes polímeros (Eaton and Hofrichter, 1987; Hebbel, 1991). A polimerização da Hb S desoxigenada é o evento primário na patogênese molecular da anemia falciforme, resultando na distorção da forma do eritrócito e diminuição acentuada da sua capacidade de sofrer deformação (Bunn, 1997).

### **I. 2.1.2 Hemoglobina C (Hb C)**

A Hb C foi a segunda hemoglobina variante a ser descrita e difere da Hb A pela substituição do ácido glutâmico pela lisina na sexta posição da cadeia  $\beta$ . É encontrada predominantemente em negros da África Ocidental, principalmente ao norte de Gana, onde atinge prevalência em torno de 20% (Weatherall and Clegg, 1981). Comparativamente à Hb S, a Hb C é menos disseminada nas populações africanas, e atribui-se ao Rio Níger o papel de barreira geográfica responsável, exercendo um efeito limitador dessa distribuição (Flint, Harding et al., 1998).

Os heterozigotos para Hb C (Hb AC) são assintomáticos e não apresentam alterações hematológicas, exceto por um aumento de células em alvo reconhecidos na distensão sanguínea. Já os indivíduos homozigotos para Hb C (Hb CC) apresentam uma anemia hemolítica em grau variável e geralmente são assintomáticos, com alguns registros de dores abdominais e manifestações hemorrágicas. A dupla heterozigose da Hb S com a Hb C (Hb SC) causa uma anemia hemolítica clinicamente significativa (Giardine, van Baal et al., 2007).

## I. 2.2 Talassemias

Talassemia pode ser definida como uma condição na qual a ausência ou redução da taxa de síntese de uma ou mais cadeias globínicas leva ao desequilíbrio na síntese das cadeias que normalmente são expressas em igual quantidade. Isso acarreta uma produção ineficiente de hemoglobina e dano aos eritrócitos (hemólise) ou aos seus precursores (eritropoese ineficaz), devido aos efeitos da persistência das subunidades globínicas (cadeias solteiras) que estão sendo produzidas em excesso relativo. O resultado é a produção de eritrócitos microcíticos e hipocrômicos e graus variados de anemia (Weatherall and Clegg, 1999). O aspecto básico da talassemia é, portanto, quantitativo, contrastando com as alterações qualitativas das hemoglobinopatias estruturais. Destaca-se que já foram descritas aproximadamente 400 mutações que determinam as talassemias (Giardine, van Baal et al., 2007).

Como a alteração primária em todas as formas de talassemias é a síntese reduzida ou ausente de uma ou mais cadeias globínicas, as manifestações clínicas após o nascimento ocorrem apenas quando estas atingem as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , necessárias para a síntese de Hb A ( $\alpha_2 \beta_2$ ). Lesões graves na síntese de outras cadeias ( $\gamma$ ,  $\epsilon$  ou  $\zeta$ ) provavelmente são letais ainda no período intrauterino (Hoffman, Benz Jr et al., 2000).

As talassemias podem ser classificadas de acordo com a (s) cadeia (s) globínica (s) cuja síntese está afetada. Assim, a síntese de globina  $\alpha$  está reduzida ou suprimida na talassemia  $\alpha$ , a síntese de globina  $\beta$  está diminuída ou suprimida na talassemia  $\beta$ , a síntese de globinas  $\delta$  e  $\beta$  está diminuída ou suprimida na talassemia  $\delta\beta$ , e assim por diante (Weatherall and Provan, 2000).

Pelo apresentado anteriormente na ontogenia das cadeias globínicas (Figura 1), a Hb F ( $\alpha_2 \gamma_2$ ) é a hemoglobina que se encontra em maior concentração na época do

nascimento. Embora o declínio da síntese de cadeias  $\gamma$  e o aumento da síntese de cadeias  $\beta$  iniciem antes do nascimento, a mudança na composição hemoglobínica no sangue periférico ocorre mais tardiamente, devido ao longo tempo médio de vida dos eritrócitos (120 dias). Dessa maneira, a Hb F é então substituída lentamente pela Hb A. As consequências fisiopatológicas são que as lesões que atingem as cadeias  $\alpha$  tendem a ser sintomáticas já no período uterino, enquanto aquelas que atingem a síntese de cadeias  $\beta$  aparecem em torno do sexto mês de vida (Hoffman, Benz Jr et al., 2000).

Possivelmente devido a diferenças nos complexos gênicos das globinas  $\alpha$  e  $\beta$ , a patologia molecular das talassemias é completamente diferente. A maioria das talassemias  $\alpha$  resulta de deleções gênicas totais ou parciais, enquanto que o conjunto das talassemias  $\beta$  é causado por mutações de ponto dentro ou na adjacência dos genes de globina  $\beta$ , podendo afetar a expressão ou a regulação destes (Higgs, Vickers et al., 1989; Weatherall and Clegg, 1999).

### **I. 2.2.1 Talassemias alfa**

As talassemias  $\alpha$  são caracterizadas pela deficiência parcial ou completa da síntese da cadeia  $\alpha$  nas hemácias de indivíduos afetados (Spritz and Forget, 1983; Baysal, Qin et al., 1994). Elas surgem, principalmente, por defeitos herdados que afetam a expressão do (s) genes (s) que codifica (m) a cadeia  $\alpha$ , embora defeitos nesta síntese também possam ocorrer de forma adquirida (Liebhaber, 1989; Bernini and Hartevelde, 1998).

A grande maioria das talassemias  $\alpha$  resulta de deleções de um ( $\alpha^+$ ) ou dois ( $\alpha^0$ ) genes de globina  $\alpha$ , enquanto processos por não deleção podem ocasionar tal quadro, mas em frequência muito menor (15-20%) (Higgs, Vickers et al., 1989). Embora os genes  $\alpha$  ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ) codifiquem o mesmo polipeptídeo, a maioria das lesões moleculares foi descrita no gene  $\alpha_2$ . Foi sugerido que esse predomínio deva-se ao fato de que a taxa de síntese desse gene é 2,6 vezes superior à do gene  $\alpha_1$ , logo, apresentando maior impacto sobre a síntese de cadeias  $\alpha$ . Esse fato é corroborado por estudo em variantes de cadeia  $\alpha$ , onde o percentual das variantes do gene  $\alpha_2$  é maior do que o percentual apresentado por variantes do gene  $\alpha_1$ , como por exemplo, na Hb Winnipeg (Moradkhani, Prehu et al., 2009). Dessa maneira, defeitos no gene  $\alpha_2$  apresentariam

manifestações fenotípicas mais graves e, portanto, seriam mais facilmente identificados (Higgs, Vickers et al., 1989; Liebhaber, 1989).

Existem duas deleções principais que resultam na talassemia  $\alpha^+$ : uma que envolve a perda de um fragmento de 3,7 Kb de DNA (deleção  $-\alpha^{3,7}$ ), frequente em populações da África, Mediterrâneo, Índia e Melanésia, e outra que envolve a perda de um fragmento de 4,2 Kb de DNA (deleção  $-\alpha^{4,2}$ ), encontrada em populações do sudeste da Ásia e áreas do Pacífico (Baysal, Qin et al. 1994). Além dessas deleções, outras deleções raras envolvendo o gene  $\alpha_1$  ( $-\alpha^{3,5}$ ), o gene  $\alpha_2$  [ $(\alpha)\alpha^{5,3}$ ] e elementos de regulação do gene  $\alpha$  já foram descritas (Steinberg, Coleman et al. 1986; Hatton, Wilkie et al., 1990; Lacerra, Fioretti et al., 1991; Foglietta, Deidda et al., 1996; Viprakasit, Harteveld et al., 2006).

Adicionalmente às deleções mais frequentes ( $-\alpha^{3,7}$ ) e ( $-\alpha^{4,2}$ ), uma grande variedade de deleções mais extensas, embora menos frequentes, ocorre dentro do complexo gênico da globina  $\alpha$  afetando a sua expressão (Liebhaber, 1989). Elas variam desde pequenos fragmentos ( $-\alpha^{5,2}$ ) até aquelas que removem o agrupamento  $\alpha$  inteiro ( $--^{MED}$ ,  $--^{Fil}$ ,  $--^{SEA}$ ,  $--^{Thai}$ ) (Higgs, Vickers et al., 1989; Bernini and Harteveld, 1998; Chui and Wayne, 1998). As deleções  $-\alpha^{20,5}$  e  $--^{MED}$  são encontradas em populações mediterrâneas, enquanto a deleção  $--^{SEA}$  é mais frequente no sudeste da Ásia (Kattamis, Camaschella et al. 1996).

O efeito da associação da talassemia  $\alpha$  e variantes de cadeia  $\beta$ , como a Hb S e a Hb C, pode alterar a quantidade de hemoglobina variante presente nos casos de heterozigose (Hb AS e Hb AC). Nota-se, nesses casos, que a concentração da hemoglobina variante decresce proporcionalmente ao número de genes  $\alpha$  afetados, sendo mais acentuado nos casos de talassemia  $\alpha^0$ . Essa diminuição pode ser devida ao fato de as cadeias  $\beta$  presentes na Hb A estarem carregadas negativamente e formarem dímeros mais facilmente do que aquelas carregadas mais positivamente pela mutação sofrida: as cadeias  $\beta^S$  ( $Glu^- \rightarrow Val^0$ ) e as cadeias  $\beta^C$  ( $Glu^- \rightarrow Lis^+$ ) (Liebhaber, 1989).

Clinicamente, os fenótipos das talassemias  $\alpha$  variam desde uma discreta anemia microcítica hipocrômica (decorrentes da perda de 1 ou 2 dos genes  $\alpha$ ) a uma anemia hemolítica de gravidade variável caracterizada pela presença de Hb H (Doença de Hb H) ou uma Síndrome de Hidropisia Fetal. Enquanto a Doença de Hb H ocorre devido à

perda de três genes  $\alpha$ , na Hidropsia Fetal ocorre a perda dos quatro genes  $\alpha$ . Ela é caracterizada por uma grave anemia intrauterina, com morte no período fetal ou perinatal (Higgs and Weatherall, 2009).

### **I. 2.2.2 Talassemias beta**

As talassemias  $\beta$  são caracterizadas pela deficiência parcial ( $\beta^+$ ) ou total ( $\beta^0$ ) da síntese das cadeias  $\beta$  nos eritrócitos de indivíduos afetados. A grande maioria delas é causada por mutações de ponto dentro do gene  $\beta$  ou nas sequências flanqueadoras e podem afetar qualquer nível da regulação gênica (Thein, 2004).

Como apresentado anteriormente, mais de 400 mutações determinam algum tipo de fenótipo talassêmico  $\alpha$  ou  $\beta$ . Contrastando com as formas deletoriais, principais responsáveis pela talassemia  $\alpha$ , mais de 200 mutações no gene da globina  $\beta$  podem determinar talassemia  $\beta$ . Algumas dessas mutações suprimem totalmente a síntese de cadeias  $\beta$  (talassemia  $\beta^0$ ) ou reduzem a expressão do gene  $\beta$  (talassemia  $\beta^+$ ) (Giardine, van Baal et al., 2007). Esses eventos resultam em uma diminuição na síntese de globina  $\beta$  e conseqüente excesso de globina  $\alpha$ , que se combina com as cadeias  $\delta$  e  $\gamma$ , contribuindo para o aumento das Hb A<sub>2</sub> e Hb F, respectivamente (Rund and Rachmilewitz, 2005).

Destaca-se que entre essas 200 mutações determinantes de talassemias  $\beta$ , estudos populacionais indicam que não mais do que 40 delas sejam responsáveis por 90% ou mais dessas talassemias no mundo, com um número variável de outras raras, com cada população apresentando um conjunto próprio de mutações mais prevalentes (Thein, 2005).

Clinicamente, as talassemias  $\beta$  são heterogêneas em função da ampla variedade das alterações gênicas acima apresentadas. Dessa forma, a apresentação clínica pode variar desde uma forma mais grave, com anemia profunda, dependente de transfusão sanguínea, como a talassemia  $\beta$  maior, até quadros leves, frequentemente assintomáticos, ou com uma discreta anemia microcítica e hipocrômica, como no traço talassêmico  $\beta$  (Bianco, Cappabianca et al., 1997; Quek and Thein, 2007).

### **I. 3 Modificadores genéticos das hemoglobinopatias**

Como os defeitos que envolvem várias doenças genéticas permanecem incompreendidos, está claro que pacientes com o mesmo genótipo podem apresentar diversas condições clínicas diferentes, mesmo no caso de doenças monogênicas. A diversidade fenotípica das talassemias  $\beta$  é o exemplo de como se pode gerar um amplo espectro de manifestações clínicas relacionadas a uma doença. O fator mais dependente e preditivo do fenótipo da doença é a natureza da mutação. 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).

Existem diferenças fundamentais entre os tipos de moduladores genéticos que influenciam o fenótipo tanto das talassemias quanto das hemoglobinas variantes. Enquanto o primeiro grupo apresenta como principal efeito modulador a própria natureza da mutação, no último grupo, muito da variabilidade fenotípica não está relacionada exclusivamente à mutação apresentada. Por exemplo, nas talassemias, as principais manifestações estão relacionadas ao grau de anemia e à eritropoiese ineficaz, relacionadas ou condicionadas pela mutação primária. Já na anemia falciforme, as alterações fisiopatológicas estão relacionadas aos eventos vasooclusivos em vários órgãos e as manifestações estão apenas parcialmente relacionadas ao grau de anemia (Rund and Fucharoen, 2008).

Estudos têm mostrado evidências do efeito de variantes gênicas atuando em diversos processos fisiológicos e que têm efeito modulador sobre o fenótipo de pacientes com talassemias e hemoglobinas variantes, principalmente a anemia falciforme. Dentre essas variantes, podem ser citados: polimorfismos no gene da UGT1A1, relacionados à hiperbillirrubemia e cálculos biliares (Galanello, Piras et al., 2001; Borgna-Pignatti, Rigon et al. 2003); homozigotos para a mutação C282Y da Hemocromatose Hereditária, resultando em aumento dos níveis séricos de ferritina, com consequente acúmulo de ferro no organismo (Martins, Picanco et al., 2004; Oliveira, Souza et al., 2006; Hagve, Asberg et al., 2009); mutações nos genes receptores de estrogênio e vitamina D, relacionados à osteopenia e osteoporose (Ferrara, Matarese et al., 2002; Tantawy, El Kholy et al., 2008); polimorfismos no HS-40, influenciando a expressão dos genes  $\alpha$  (Ribeiro, Zaccariotto et al., 2009), entre outros.

#### **I. 4 Distribuição geográfica das hemoglobinopatias estruturais e talassemias**

As hemoglobinopatias estruturais e talassemias representam uma das principais doenças genéticas que contribuem de forma expressiva para a morbidade e a mortalidade infantil em diversos países em desenvolvimento (WHO, 1982). Em geral, a alta prevalência das hemoglobinopatias e talassemias pode ser decorrente de dois mecanismos: as mutações são favorecidas nas populações autóctones por força do efeito seletivo da malária, onde os indivíduos afetados são mais resistentes ou, alternativamente, são inseridas pela imigração de uma população previamente afetada. O primeiro mecanismo, a seleção de heterozigotos em áreas com elevada incidência de malária, explica as altas frequências de hemoglobinopatias e talassemias nos países da região Mediterrânea, no Oriente Médio, Sudoeste da Ásia e na África, como discutido acima. Por outro lado, a imigração espontânea ou forçada é responsável por sua ocorrência nos países do Novo Mundo, incluindo o Brasil. Nesse particular, cabe destacar que a introdução da malária no continente americano ocorreu em época relativamente recente, após a chegada dos colonizadores europeus, não contribuindo para aumentar a prevalência de hemoglobinopatias e talassemias. Isso explica por que os trabalhos realizados em populações indígenas não miscigenadas demonstram a completa ausência desses distúrbios (Salzano and Bortolini, 2002).

A “hipótese da malária” é defendida com base em alguns achados. Primeiro, apesar das diferenças moleculares, a distribuição mundial das hemoglobinopatias e talassemias coincide com a distribuição da malária. Segundo, a caracterização molecular e a análise de haplótipos revelam um padrão comum de hemoglobinopatias em uma determinada região, isto é, cada região apresenta um perfil típico de mutações, o que direciona para uma causa comum. Terceiro, estudos epidemiológicos mostram uma forte relação entre a prevalência de uma determinada hemoglobinopatia ou talassemia e a malária (Flint, Harding et al., 1998).

O efeito protetor de várias hemoglobinopatias e talassemias sobre a malária tem sido apresentado em diversos estudos. Sem dúvida alguma, a Hb S mostrou um efeito protetor contra a maioria, senão todas as formas clínicas da malária (Allison, 1954; Luzzatto, Nwachuku-Jarrett et al., 1970; Allison, 2009). May et al. (2007) demonstraram uma associação negativa entre os heterozigotos para Hb C (Hb AC) e talassêmicos  $\alpha$  e a malária cerebral e anemia grave. Fowkes et al. (2008) demonstraram



que o aumento no número de eritrócitos e a microcitose em crianças homozigotas para talassemia  $\alpha^+$  apresentava um efeito protetor contra a anemia grave gerada pela malária.

Entretanto, alguns questionamentos surgem sobre a eficiência total dessa hipótese para explicar a distribuição das hemoglobinopatias, tais como: a) por que algumas hemoglobinopatias são frequentes em regiões não-malarígenas, como a Polinésia?; b) Por que as regiões malarígenas apresentam diferentes prevalências ou padrões hemoglobínicos? Para explicar esses questionamentos, mais estudos devem ser realizados, tanto em nível bioquímico quanto molecular.

Outro aspecto que auxilia no entendimento da distribuição das hemoglobinopatias e talassemias é o estudo dos haplótipos (associação não randômica da combinação de vários polimorfismos) dos agrupamentos dos genes das cadeias globínicas. Essa avaliação permite reconstruir a história das mutações, a importância dos processos migratórios e os processos de seleção que ocorreram em um determinado local (Flint, Harding et al., 1998).

O estudo dos haplótipos da globina  $\beta$  tem sido largamente utilizado em estudos populacionais, com grande importância do ponto de vista histórico e antropológico (Wainscoat, Bell et al., 1983; Pagnier, Mears et al., 1984; Kulozik, Wainscoat et al., 1986; Lapoumeroulie, Dunda et al., 1992; Baysal, Sharma et al., 1994; Bevilaqua, Mattevi et al., 1995; Crawford, Caggana et al., 2002). Através da análise dos resultados obtidos, foi demonstrado, por exemplo, a origem multicêntrica da Hb S, com quatro mutações Africanas e uma Asiática, denominadas de Bantu, Benin, Senegal, Camarões e Árabe-Indiano, de acordo com a região de origem e locais onde predominam (Pagnier, Mears et al., 1984; Kulozik, Wainscoat et al., 1986; Lapoumeroulie, Dunda et al., 1992). Esses dados sugerem que a Hb S surgiu por mutações independentes várias vezes e quando esse evento ocorreu, seu efeito protetor à infecção pela malária favoreceu o aumento da frequência do gene  $\beta^S$ .

Além dos estudos históricos e antropológicos, a investigação dos haplótipos também tem sido usada na tentativa de correlacionar a presença dos mesmos na determinação de prognósticos clínicos, quando associados a doenças como, por exemplo, a anemia falciforme e a talassemia major (Cao, Galanello et al., 1994; Figueiredo, Kerbauy et al., 1996).

Por outro lado, Liu et al. (2009) demonstraram que o estudo dos tradicionais sítios de restrição empregados até o momento não é suficiente para definir a grande variação gênica no complexo da globina beta na Hb S e sugerem a genotipagem de um número maior de *SNPs*, a fim de correlacionar o genótipo com o fenótipo apresentado pelos pacientes.

Com o objetivo de determinar a prevalência das hemoglobinopatias e talassemias, a Organização Mundial da Saúde (OMS) conduziu um estudo epidemiológico global em diversas regiões do mundo. Os dados mostram que essas alterações representam um problema de saúde pública em 71% dos 229 países investigados e que estes 71% são responsáveis por cerca de 89% de todos os nascimentos no mundo. O número de crianças afetadas anualmente ultrapassa 330.000, sendo 83% com doenças falciformes e 17% com talassemias (Modell and Darlison, 2008). A Tabela 2 apresenta as prevalências estimadas de hemoglobinopatias e talassemias em diversas regiões do mundo, bem como o número de gestações afetadas.

Tabela 2: Prevalências estimadas de hemoglobinopatias e talassemias em diversas regiões do mundo, bem como o número de gestações afetadas (Adaptado de (Modell and Darlison, 2008)).

Região	Pop (milhões) 2003	% da população portadora			Gestações afetadas (/1.000)		
		Variante significativas <sup>a</sup>	$\alpha^+$ <sup>b</sup>	Qualquer var <sup>c</sup>	DF <sup>d</sup>	Tal <sup>e</sup>	Total
África	586	18,2	41,2	44,4	10,68	0,07	10,74
América	853	3,0	4,8	7,5	0,49	0,06	0,54
Mediterrâneo (Leste)	573	4,4	19,0	21,7	0,84	0,70	1,54
Europa	879	1,1	2,3	3,3	0,07	0,13	0,20
Sudeste Asiático	1.564	6,6	44,6	45,5	0,68	0,66	1,34
Pacífico (Oeste)	1.761	3,2	10,3	13,2	0,00	0,76	0,76

<sup>a</sup> Variantes significativas incluem Hb S, Hb C, Hb D, Hb E, entre outras e talassemia  $\alpha^0$  e talassemia  $\beta^0$

<sup>b</sup> talassemia  $\alpha^+$  inclui homocigotos e heterocigotos  $\alpha^+$

<sup>c</sup> Leva em conta coincidência entre variantes de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  e combinações silenciosas de variantes de cadeia  $\beta$

<sup>d</sup> DF: Doenças falciformes incluem: Hb SS, Hb SC e S/ talassemia  $\beta$

<sup>e</sup> Talassemias incluem: talassemia  $\beta$  homocigota, Hb E/ talassemia  $\beta$ , talassemia  $\alpha^0$  homocigota e heterocigose para  $\alpha^+$  e  $\alpha^0$

#### **I. 4.1 Distribuição geográfica das hemoglobinopatias e talassemias no Brasil**

A distribuição das hemoglobinopatias e talassemias no país reflete a composição étnica de cada região e, sem dúvida, a grande heterogeneidade observada configura-se numa das mais interessantes características da nossa população, formada por sucessivos fluxos migratórios. Até o descobrimento do Brasil, em 1500, o país era habitado por Ameríndios, compreendendo em torno de dois milhões de pessoas. A partir de 1500, teve início a imigração de Portugueses e entre os séculos 16 e 19 houve a chegada de Africanos (cerca de 9 milhões), trazidos pelo tráfico de escravos. Além dos Portugueses e Africanos, outros fluxos ocorreram entre os séculos 19 e 20, principalmente indivíduos oriundos da Itália, Alemanha e Espanha (Salzano and Bortolini 2002). Todos esses eventos migratórios contribuíram para a formação da população brasileira, caracterizada por uma alta taxa de miscigenação. Essa heterogeneidade tem sido descrita em vários estudos genéticos usando marcadores tanto uniparentais quanto autossômicos, que demonstram um típico, mas não uniforme, padrão para o conjunto genômico da população brasileira, dado pela contribuição de Europeus, Africanos e Ameríndios. Populações das regiões Sudeste e Sul apresentam as menores taxas de contribuição Africana e maiores de contribuição Européia quando comparadas com outras regiões do país (Salzano and Bortolini 2002; Callegari-Jacques, Grattapaglia et al., 2003; Parra, Amado et al., 2003; Zembrzusi, Callegari-Jacques et al., 2006; Leite, Callegari-Jacques et al., 2008; Leite, Santos et al., 2009).

No Brasil, poucos grupos de pesquisadores têm se dedicado de forma sistemática ao diagnóstico e investigação em nível molecular das hemoglobinopatias e talassemias, merecendo destaque os grupos da Unicamp (SP), da Universidade Federal da Bahia e Hemoba (BA), do Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD) de Minas Gerais e da Universidade Federal do Pará.

A seguir, serão apresentados os principais resultados referentes ao Brasil e, após, os dados específicos relacionados ao Rio Grande do Sul, foco deste trabalho.

Com relação à investigação da talassemia  $\alpha$ , na fase que antecede a introdução de técnicas de biologia molecular no Brasil, o diagnóstico era baseado em sistemas eletroforéticos, na detecção da Hb Bart's em neonatos e da Hb H em adultos, e citológicos para a pesquisa de precipitados de Hb H. A prevalência de talassemia  $\alpha$  era

variável (entre 0,7 e 16%), dependendo da população analisada (Sonati and Costa, 1990; Leonelli, Imperial et al., 2000; Orlando, Naoum et al., 2000).

A partir da implantação das técnicas de biologia molecular, Sonati et al. (1991) confirmaram a alta prevalência de talassemia  $\alpha$  em Campinas. Nesse estudo, cerca de 30% de uma pequena amostra de doadores de sangue afrobrasileiros apresentaram alguma forma dessa talassemia (heterozigotos, homozigotos e triplicação do gene  $\alpha$ ). Em outro estudo de 590 recém-nascidos avaliados em Salvador, 114 (22,2%) eram portadores da mutação  $-\alpha^{3,7}$  (19,7% em heterozigose e 2,5% em homozigose) (Adorno, Couto et al. 2005). Destaca-se que essas prevalências são muito maiores do que valores descritos para a região Norte do país (7%), onde a contribuição de Ameríndios é mais alta do que de Afrodescendentes (Souza, Cardoso et al., 2009).

Borges et al. (2001) estudaram a prevalência de talassemia  $\alpha$  entre indivíduos adultos com microcitose e hipocromia sem anemia. Dos 339 indivíduos analisados, 169 (49,9 %) apresentaram talassemia  $\alpha$ , sendo que 145 (42,8%) foram classificados como heterozigotos para a deleção  $-\alpha^{3,7}$  ( $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ ), 18 (5,3%) foram classificados como homozigotos para esta deleção ( $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$ ), além de 5 (1,5%) indivíduos com formas não-delecionais e 1 (0,3%) com deleção do tipo  $\alpha^0$ . Nesse mesmo estudo, dos 98 afrodescendentes investigados, 69 (70,3%) apresentaram talassemia  $\alpha$ .

Já com relação às talassemias  $\beta$ , Zago et al. (1983), em uma revisão de dados sobre hemoglobinopatias no Brasil, mostraram que as talassemias  $\beta$  estão entre os distúrbios mais frequentes em população hospitalar. Os resultados apresentaram variações de 0,8% na população geral até 35,2% entre pacientes selecionados de um serviço de hematologia, tendo sido introduzidas predominantemente pelos imigrantes italianos e apresentando grande variabilidade de um estado para outro.

Em nível molecular, as mutações determinantes de talassemia  $\beta$  também apresentam uma grande variabilidade no país. Em Pernambuco, a mutação IVS-1-6 é a mais frequente (62,8%), seguida da IVS-1-1 (15,1%), IVS-1-110 (8,2%) e a mutação de códon 39 (3,5%) (Araujo, Silva et al., 2003). Esse quadro difere do apresentado pelos indivíduos da região de São Paulo, que apresentam a mutação de códon 39 como a mais frequente (64,3%), seguidas da IVS-1-110 (20%), IVS-1-6 (7,1) e IVS-1-1 (5,7%) (Martins, Ramalho et al., 1993). Essas diferenças são explicadas pela origem das

populações que colonizaram essas regiões, tais como portugueses e italianos (Kattamis, Hu et al. 1990; Ribeiro, Goncalves et al., 1997; Faustino, Pacheco et al., 1999).

A prevalência das hemoglobinas variantes, com destaque para a Hb S e Hb C, em diversas partes do país, teve seu estabelecimento efetivo, principalmente, após a inclusão da investigação das hemoglobinopatias na triagem neonatal em 2001, e será apresentada adiante.

#### **I. 4.2 Distribuição geográfica das hemoglobinopatias e talassemias no Rio Grande do Sul**

No estado do Rio Grande do Sul, dois trabalhos foram realizados para investigação de talassemia  $\alpha$ . Pedrollo et al. (1990), utilizando como indicador de talassemia  $\alpha$  a presença de Hb Bart's no sangue de cordão umbilical em recém-nascidos em Porto Alegre, através de eletroforese de hemoglobina em fita de acetato de celulose, estimaram que a prevalência de talassemia  $\alpha$  em afrobrasileiros e eurobrasileiros é de 6% e 2,5% respectivamente. Esse dado é certamente uma subestimativa, assim como os outros trabalhos realizados com esse método, pois nem todas as crianças portadoras do traço talassêmico  $\alpha$  apresentam Hb Bart's em nível detectável por essa técnica (>1%) no período do nascimento (Higgs, Lamb et al., 1982).

Em outro estudo, realizado por Daudt et al. (2002), no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), das 1615 amostras de sangue de recém-nascidos analisadas pela técnica de focalização isoelétrica (FIE), em apenas 2 (0,12%) foi identificada a presença de Hb Bart's. Justifica-se esse baixo índice pela falha na técnica, uma vez que as amostras foram coletadas em papel filtro e foram processadas, em média, 22 dias após a coletas. Nesse meio, as hemoglobinas perdem sua estabilidade decorrente da oxidação do ferro da fração heme e da ação de resíduos de glutamina e asparagina na molécula protéica, prejudicando a identificação de bandas rápidas, tais como a Hb Bart's.

Com relação à talassemia  $\beta$ , Freitas e Rocha (1983) relataram uma frequência de 1,1% de heterozigotos para essa talassemia em 704 caucasóides de Porto Alegre. Já Farinon (1992) identificou 34,2% de uma amostra de indivíduos anêmicos com essa condição. Em doadores de banco de sangue, em Caxias do Sul, a prevalência de talassemia  $\beta$  foi estimada em 9,8%, através de dosagem de Hb A<sub>2</sub> por eluição. Após investigação molecular, esses dados não foram reproduzidos (Lisot and Silla, 2004).

A prevalência das mutações para talassemia  $\beta$  foi determinada pelo nosso grupo em moradores de Porto Alegre e região metropolitana. A mutação de códon 39 (C>T) foi a mais frequente (50,9%), seguida de IVS-1-110 (18,1%), IVS-1-1 (12,9%) e IVS-1-6 (9,5%). Outras mutações somaram 8,6% (Reichert, de Castro et al., 2008).

A prevalência de Hbs variantes foi investigada em Porto Alegre por Salzano et al. (1968). Os resultados mostraram frequências de 0,1%, 2,7% e 5,7% do gene para Hb S em grupos de indivíduos brancos, mistos e negros, respectivamente. Para o gene da Hb C, as frequências identificadas foram de 0,3%, 0,5% e 0,7% para os mesmos grupos, respectivamente. Em outro estudo, a frequência do gene Hb S e da Hb C foi de 1,7% e 0,9% entre afrodescendentes e de 0,4% de Hb S entre eurodescendentes (Weimer, Salzano et al., 1981). No estudo conduzido por Daudt et al. (2002), acima descrito, a prevalência das Hbs variantes também foi avaliada. Os resultados indicaram 2,5% dos indivíduos com padrões alterados; destes, 1,2% eram portadores do gene para Hb S, e 0,4% eram portadores do gene da Hb C. No Rio Grande do Sul, além das Hbs S e C, Tondo et al. (1963) descreveram a presença de uma hemoglobina com padrão de migração eletroforética entre a Hb S e a Hb C em uma família de descendência Portuguesa, denominada Hb Porto Alegre. Estudos posteriores mostraram sua presença em outras regiões do país, além da Argentina, Cuba e Venezuela (Seid-Akhavan, Ayres et al., 1973; Penalver and de Miani, 1974; Colombo and Martinez, 1985; Salzano, 2000).

## **I. 5 Triagem neonatal**

A triagem neonatal é uma estratégia utilizada em saúde pública a fim de rastrear, dentro de uma população considerada “normal”, indivíduos que estão em risco de desenvolver uma doença específica e que se beneficiariam de investigação adicional (para confirmar e/ou excluir esse risco) e de ação preventiva/terapêutica imediatas (Souza, Schwartz et al., 2002).

No contexto das doenças falciformes, os benefícios do diagnóstico e da intervenção precoce têm levado à ampla difusão em todo o mundo de programas para a detecção dessas condições. Estudos têm demonstrado que o diagnóstico precoce, associado a medidas preventivas, pode levar à redução da morbidade e mortalidade nos primeiros anos de vida (Almeida, Henthorn et al., 2001; Bardakdjian-Michau, Guilloud-Bataillie et al., 2002). Além disso, o uso profilático de penicilina, a administração de

vacina antipneumocócica e outros cuidados intensivos aumentam significativamente a sobrevivência e a qualidade de vida dos portadores de doenças falciformes, diminuem as sequelas e atenuam as complicações clínicas, tais como crises dolorosas e sequestros esplênicos (Almeida, Henthorn et al., 2001; Ramalho, Magna et al., 2003; Henthorn, Almeida et al., 2004). Estudos mostram a efetividade dos programas de triagem, associados ao atendimento médico adequado e educação e suporte aos pais, em vários países, tais como Estados Unidos, Jamaica e Reino Unido (Vichinsky, Hurst et al., 1988; Vichinsky, 1991; Lee, Thomas et al., 1995; Frempong and Pearson, 2007; King, Fraser et al., 2007; Telfer, Coen et al., 2007).

Destaca-se que, além das doenças falciformes, os testes de triagem neonatal permitem a identificação de portadores de talassemia  $\beta$  maior e heterozigotes para Hbs variantes, permitindo tratamento adequado aos portadores de doenças e atuando em nível de prevenção primária através da identificação e aconselhamento aos portadores (Giordano, 2009).

Devido às razões acima apresentadas, programas de triagem neonatal foram e têm sido implantados em diversas partes do mundo, inclusive em países onde as hemoglobinopatias não eram comuns, tais como Inglaterra, França, Holanda e Alemanha (Bardakdjian-Michau, Guilloud-Bataillie et al., 2002; Howard and Davies, 2007; Modell, Darlison et al., 2007; Theodorsson, Birgens et al., 2007; Dickerhoff, Genzel-Boroviczeny et al., 2009; Giordano, 2009). A triagem nesses países assumiu importância através da mudança de padrão migratório sofrido, principalmente a partir da Segunda Guerra Mundial, com grande incremento nas últimas décadas (Bain, 2009). Resultados dos principais estudos encontram-se na Tabela 3. Em alguns deles, merece destaque a grande diferença encontrada dentro do mesmo país, dependendo do contingente migratório, reforçando a importância da mudança de perfil hemoglobínico. Por exemplo, a Inglaterra, onde a triagem para hemoglobinopatias foi incorporada ao Programa Nacional de Triagem Neonatal em 2004, apresenta uma prevalência de 0,5% para doenças falciformes. Em determinadas regiões do país, tais como Londres, esse valor sobe para 1,8% (Streetly, Latinovic et al., 2009).

Tabela 3: Resultados da triagem neonatal para hemoglobinopatias em diversos países

Local	N	DF <sup>a</sup>	Heterozigotos <sup>b</sup>	Referência
		N (prevalência)	N (prevalência)	
Inglaterra	1.198.614	651 (1:1.840)	17.373 (1:69)	(Streetly, Latinovic et al. 2009)
Inglaterra (Londres)	239.654	436 (1:550)	9.566 (1:25)	(Streetly, Latinovic et al. 2009)
Bélgica (Bruxelas)	118.366	64 (1:1.850)	Hb AS (1:70)	(Gulbis, Ferster et al. 2006) <sup>c</sup>
Bélgica	27.010	Hb SS: 3 (1:9.000)	Hb AS: 106 (1:255) Hb AC: 3 (1:9.000)	(Boemer, Vanbellinghen et al. 2006)
Alemanha	306	Hb SS: 1 (1:306)	Hb AS: 28 (1:11) Hb AC: 8 (1:38)	(Dickerhoff, Genzel-Boroviczeny et al. 2009) <sup>d</sup>
Holanda	~180.000	~50-60 (1:3.000–1:3.600)	N.I	(Giordano 2009) <sup>e</sup>
Espanha (Catalônia)	4.020	N.I (1:475)	N.I	(Manu Pereira Mdel, Cabot et al. 2007) <sup>f</sup>
Espanha (Madri)	190.238	31 (1:6.136)	1.060 (1:179)	(Joyanes, Moro et al. 2006) <sup>g</sup>
Portugal	400	-	Hb AS: 6 (1:67)	(Peres, Romao et al. 1995)
Benin	2.070	Hb SS: 16 (1:129) Hb SC: 28 (1:73)	Hb AS: 528 (1:3,9) Hb AC: 135 (1:15)	(Rahimy, Gangbo et al. 2009) <sup>h</sup>
Congo	31.204	Hb SS: 428 (1:73)	Hb AS: 5.276 (1:5,9)	(Tshilolo, Aissi et al. 2009)
Estados Unidos (Califórnia)	~530.000 nascimentos/ano	N.I (1:6.600)	N.I 1:75	(Michlitsch, Azimi et al. 2009)
Estados Unidos (Nova Iorque)	N.I	N.I (1:615)	N.I Hb AS (1:11,8)	(Lerner, Platania et al. 2009) <sup>i</sup>
Canadá (Quebec)	2.779	N.I	N.I	(Yorke, Mitchell et al. 1992) <sup>j</sup>
Jamaica	104.817	Hb SS: 404 (1:260) Hb SC: 212 (1:494) Hb CC: 90 (1:1.164)	Hb AS: 10.268 (1:10) Hb AC: 3.854 (1:27)	(Hanchard, Hambleton et al. 2005)
Venezuela	101.301	Hb SC: 19 (1:5.331) Hb SD: 9 (1:11.256)	Hb AS: 1.351 (1:75) Hb AC: 461 (1:220) Hb AD: 149 (1:680)	(Gimenez, Torrealba et al. 2009)
Argentina	1.000	-	Hb AS: 5 (1:200)	(Noguera, Bragos et al. 1999) <sup>k</sup>



<sup>a</sup> DF: Doenças falciformes incluem: Hb SS, Hb SC, Hb S/Talassemia  $\beta$

<sup>b</sup> Heterozigotos: Hb AS, Hb AC, Hb AD e outras associações.

<sup>c</sup> Maior parte dos portadores é de origem africana.

<sup>d</sup> Número constituído apenas de filhos de mães africanas. Triagem não é universal e propõem estudo piloto em cidades com mais de 20% de imigrantes.

<sup>e</sup> Ampliar a investigação para todos os filhos de portadores.

<sup>f</sup> Em população de risco (imigrantes).

<sup>g</sup> Genitores de 44 países de origem.

<sup>h</sup> Número constituído de gestantes da segunda maior maternidade de Benin.

<sup>i</sup> Prevalências em negros. DF avaliadas entre 1980-2006 e heterozigoses avaliadas entre 1989-2006.

<sup>j</sup> A maioria dos genes para Hb S (71%) foi encontrada em indivíduos negros (autodeterminados).

<sup>k</sup> Os autores sugerem que a baixa frequência não justifica a triagem populacional.

N.I: Não informado

### **I. 5.1 A triagem neonatal no Brasil**

Os programas de triagem neonatal começaram no Brasil em 1976, através de iniciativas isoladas, sem políticas e/ou regulamentação do governo, com a introdução do programa para triagem da Fenilcetonúria, através da Associação de Pais e Amigos de Excepcionais (Apae) em São Paulo. Em 1986 o programa foi ampliado com a pesquisa de Hipotireoidismo Congênito. De acordo com o Ministério da Saúde, a cobertura da triagem neonatal em 2007 era de 79%, com 13 estados em Fase I da triagem (Fenilcetonúria e Hipotireodismo Congênito), 11 estados em Fase II (Fase I + Hemoglobinopatias) e 3 estados em Fase III (Fase II + Fibrose Cística) (Saúde, 2010).

Em 2001, o Ministério da Saúde incluiu a pesquisa de hemoglobinopatias no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), através da Portaria 822/01, reconhecendo a sua relevância na saúde pública do Brasil (Ramalho, Magna et al., 2003). Os grandes estudos populacionais com objetivo de determinar a prevalência de hemoglobinas variantes iniciaram, principalmente, a partir desse período. Destaca-se que as técnicas utilizadas são baseadas principalmente em sistemas eletroforéticos (como as eletroforeses alcalina e ácida e a focalização isoelétrica - FIE) e cromatográficos (como a cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE). Essas técnicas são rápidas, apresentam alta resolução e quantificação acurada das frações hemoglobínicas, permitindo a identificação de hemoglobinas variantes (Joutovsky, Hadzi-Nesic et al., 2004). Porém, no período neonatal, a concentração de Hb F ainda encontra-se elevada, dificultando o diagnóstico de talassemias  $\beta$ , bem como a sua interação com hemoglobinas variantes.

Diversos estudos têm apresentado diferenças regionais importantes relacionadas à prevalência de Hb S e Hb C, variando de 1,5% de Hb AS no Paraná e Rio Grande do Norte a 9,8% na Bahia (de Araujo, Serafim et al., 2004; Adorno, Couto et al., 2005; Watanabe, Pianovski et al., 2008). Quando avaliada de acordo com a origem, a prevalência de Hb S alcança 15,4% nos afrodescendentes (Adorno, Couto et al., 2005). A Tabela 4 apresenta a prevalência das doenças falciformes (Hb SS, Hb SC e Hb S/Talassemia  $\beta$ ) e as heterozigoses (Hb AS, Hb AC e Hb D) em recém-nascidos em diversas regiões do Brasil.

Tabela 4: Prevalência das doenças falciformes e heterozigoses para hemoglobinas variantes no Brasil em recém-nascidos.

População	N	Doença falciforme <sup>a</sup> N (prevalência)	Heterozigose <sup>b</sup> N - % (prevalência)	Referência
Natal – Rio Grande do Norte (Nordeste)	1940	Hb SS: 1 (1:1940)	Hb AS: 29 - 1,5% (1:69) Hb AC: 6 - 0,3% (1:323)	(de Araujo, Serafim et al. 2004)
Alagoas (Nordeste)	19.946	Hb SS: 11 (1:1.813) Hb SC: 2 (1:9.973)	Hb AS: 469 - 2,3% (1:43) Hb AC: 140 - 0,7% (1:142)	(Lipinski-Figueiredo, Estelita et al. 2009)
Salvador – Bahia (Nordeste)	502	Hb SS: 1 (1:502) Hb SC: 4 (1:125)	Hb AS: 57 - 9,8% (1:9) Hb AC: 38 - 6,5% (1:13)	(Adorno, Couto et al. 2005)
Brasília – Distrito Federal (Centro-Oeste)	116.271	Hb SS: 109 (1:1.067)	Hb AS: 3.760 - 3,2% (1:31)	(Diniz, Guedes et al. 2009)
Minas Gerais (Sudeste)	605.419	Hb SS: 486 (1:1.246)	Hb AS: 3,2% Hb AC: 1,3%	(Serjeant 2000)
Minas Gerais (Sudeste)	128.326	Hb SS: 46 (1:2.790) Hb SC: 37 (1:3.470) Hb S/tal $\beta$ : 4 (1:32.082)	Hb AS: 4.221 - 3,29% (1:30) Hb AC: 1.558 - 1,21% (1:82)	(Paixao, Cunha Ferraz et al. 2001)
Espírito Santo (Sudeste)	331.273	Hb SS: 123 (1:2.693)	Hb AS: 10.872 - 3,3% (1:30) Hb AC: 3.210 - 0,9% (1:103) Hb AD: 156 (1:2.123) Hb AV <sup>c</sup> : 72 (1:4.600)	(Bravin, Correia et al. 2009)
Rio de Janeiro (Sudeste)	99.260	Hb SS: 62 (1:1.600) Hb SC: 18 (1:5.514) Hb SD 3 (1:33.087)	Hb AS: 3.933 - 3,96% (1:25) Hb AC: 588 - 0,59% (1:169) Hb AD: 142 - 0,14% (1:699)	(Lobo, Bueno et al. 2003)
São Paulo (Sudeste)	1.565.439	Hb SS: 393 (1:3.983) Hb SC: 251 (1:6.236) Hb S/tal $\beta$ : 52 (1:30.104)	Hb AS: 38.922 - 2,49% (1:40) Hb AC: 12.271 - 0,78% (1:126)	(Hadachi, Iskandar et al. 2009)
Campinas – São Paulo (Sudeste)	281.884	Hb SS: 29 (1:9.720) Hb SC: 26 (1:10.842) Hb S/ tal $\beta$ : 4 (1:70.470) Hb SC: 26 (1:10.842)	Hb AS: 5.197 - 1,98% (1:54) Hb AC: 1.615 - 0,57% (1:175)	(Brandelise, Pinheiro et al. 2004)
Ribeirão Preto e região (Sudeste)	103.021	Hb SS: 14 (1: 7.358) Hb SC: 11 (1: 9.365)	Hb AS: 2.747 - 2,7% (1:37)	(Magalhaes, Turcato Mde et al. 2009)
Paraná (Sul)	548.810	Hb SS: 12 (1:45.734) Hb S/tal $\beta$ : 15 (1:36.587)	Hb AS: 8.321 - 1,52% (1:66)	(Watanabe, Pianovski et al. 2008)

<sup>a</sup> Doença Falciforme: Hb SS, Hb SC e Hb S/talassemia  $\beta$

<sup>b</sup> Heterozigose: Hb AS, Hb AC e Hb D

<sup>c</sup> Hb AV: heterozigose para variante rara não identificada

Como apresentado anteriormente, a maioria das Hbs variantes não produz efeitos clínicos significativos e nem alterações hematológicas. Dessa maneira, a triagem neonatal constitui-se em uma grande oportunidade da detecção dessas hemoglobinas, além das Hb S, Hb C e Hb D tradicionalmente identificadas.

A associação de diversas técnicas baseadas em sistemas eletroforéticos, cromatográficos e moleculares, além de testes funcionais, tem permitido a identificação de diversas Hbs variantes raras entre diferentes grupos de indivíduos, desde recém-nascidos rastreados nos programas de triagem, doadores de sangue e pacientes com anemia a esclarecer. Dentre elas podem ser citadas a Hb Zurich, a Hb Miami, a Hb Osu-Christiansborg e a Hb Deer-Lodge, sendo algumas destas mutações *de novo* (Kimura, Oliveira et al., 2008), além de novas variantes raras, como a Hb Itapera, a Hb Bom Jesus da Lapa e Hb Boa Esperança (Jorge, Kimura et al., 2007).

## **I. 6 Justificativa e objetivos**

Como discutido acima, as hemoglobinopatias e as talassemias apresentam uma grande heterogeneidade em nível molecular e são regionalmente específicas, com cada população apresentando uma combinação de tais alterações. No Brasil, as prevalências dessas alterações têm sido determinadas e apresentam grande variabilidade entre as regiões, devendo-se isso à influência do grupo étnico predominante em uma determinada localização geográfica.

No Rio Grande do Sul, são poucos os estudos sobre o tema, sendo que a investigação molecular foi conduzida apenas com relação às talassemias  $\beta$  em pacientes com anemia microcítica (Reichert, de Castro et al., 2008). Dessa maneira, torna-se importante o conhecimento das bases moleculares das hemoglobinopatias estruturais e talassemias no Estado do Rio Grande do Sul.

A identificação do perfil hemoglobínico permitirá estabelecer fluxos de trabalho, direcionado às hemoglobinopatias mais prevalentes, o que diminui o tempo de investigação laboratorial, bem como os custos investidos para tal fim. Esses resultados ainda são úteis para determinar a alocação de recursos públicos e implantação de políticas de saúde voltadas aos doentes. Cabe ressaltar que o diagnóstico definitivo de um portador de um gene para hemoglobinopatia e/ou talassemia também apresenta o benefício do conhecimento de sua condição, evitando investigações laboratoriais,

consultas médicas e suplementação desnecessária de ferro (no caso dos traços talassêmicos), bem como a possibilidade de acesso ao aconselhamento familiar.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivos:

1- Determinar as bases moleculares para a caracterização de talassemias e hemoglobinas variantes no Estado do Rio Grande do Sul a partir dos testes de triagem neonatal.

2- Determinar a frequência de talassemia  $\alpha$  em populações diferenciadas (anemia falciforme, indivíduos com anemia microcítica a esclarecer e controles afro e eurodescendentes).

### **I. 7 Aspectos éticos e de biossegurança**

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética da UFRGS e obedeceu às Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo seres humanos (Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde).

Capítulo II

**Neonatal screening for haemoglobinopathies: the results of a public  
health system in south Brazil**

---

Manuscrito submetido à revista Genetic Testing and Molecular  
Biomarkers

**Neonatal screening for hemoglobinopathies: the results of a public health system in south Brazil**

**Sandrine C. Wagner,<sup>1,2</sup> Simone M. de Castro,<sup>3</sup> Tatiana P. Gonzalez,<sup>1</sup> Ana Paula Santin,<sup>3</sup> Carina F. Zaleski,<sup>3</sup> Laura A. Azevedo,<sup>3</sup> H el ene Dreau,<sup>4</sup> Shirley Henderson,<sup>4</sup> John Old,<sup>4</sup> Mara H. Hutz,<sup>1</sup>**

*1- Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

*2- Centro Universitário FEEVALE, Novo Hamburgo, RS, Brazil.*

*3-Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

*4- National Hemoglobinopathy Reference Laboratory, Oxford Radcliffe Hospitals NHS Trust, Oxford, England*

Corresponding author:

Mara H. Hutz  
Departamento de Genética  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Av Bento Gonçalves, 9500  
Caixa Postal 15053  
91501-970 - Porto Alegre, RS, Brazil  
Phone: 55-51-33086720  
FAX: 55 –51-33087311  
E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

**Running title:** Hemoglobinopathies in southern Brazil

## Summary

*Aim:* To estimate the prevalence of hemoglobinopathies in South Brazil. *Methods:* Samples of dried blood spots heel prick from neonates were evaluated by IEF and/or HPLC techniques. All variants were characterized at the molecular level. *Results:* A total of 437,787 samples were evaluated. Among these, 6,391 showed an abnormal hemoglobin pattern. These included 48 cases (0.01%) of sickle cell disorders (33 Hb SS, 7 Hb SC, 7 Hb S/  $\beta$  thal, 1 Hb SD), 1 neonate who was homozygous for  $\beta$  thalassaemia, 6,272 (1.4%) newborns who were heterozygous for Hb S, C or D and 71 (0.02%) neonates who were carriers for a rare hemoglobin variants. Most of these rare variants were identified for the first time in Brazil. *Conclusions:* Comparing these results with those obtained in other Brazilian regions, we observe a highly heterogeneous distribution. This knowledge is useful in healthcare planning and allocation of resources, whilst identifying at risk couples which will assist with disease prevention.

**Keywords:** Hemoglobinopathies, sickle cell disease, newborn screening, Brazil.



## **Introduction**

Hemoglobinopathies are genetic globin gene disorders, characterized by the presence of variant hemoglobin or the decrease/absence in globin chain synthesis, known as thalassemia (Weatherall and Provan 2000; Higgs and Weatherall 2009).

One of the most interesting characteristics of the Brazilian population is its heterogeneity, which is due to five centuries of inter-ethnic mixing of people from three continents (Callegari-Jacques *et al.* 2003). The southern Brazilian population differs from this general standard, southern Brazilian populations presented smaller levels of African and higher degrees of European contributions when compared with other Brazilian groups

The aim of a neonatal screening program is to identify those individuals within a population who have a specific serious disorder, in which the outcome can be improved by an early intervention. The advantages of early diagnosis conferred to babies and children with SCD include the use of prophylactic penicillin (Gaston *et al.* 1986; Davies *et al.* 2000), administration of anti-pneumococcus vaccine (Davies *et al.* 2000; Lees *et al.* 2000), and education of parents to detect symptoms of acute splenic sequestration and give comprehensive care.

The Brazilian Ministry of Health recognized the importance of hemoglobinopathies for public health in 2001 when it was decided that hemoglobinopathies would be incorporated into the National Brazilian Neonatal Screening program. The present study reports the results of 4-years of hemoglobinopathies screening in the southern Brazilian population.

## **Materials and Methods**

From January 2004 to December 2007, 437,787 samples of dried blood spots' (DBS) heel prick from neonates were collected. Samples were tested on the day when received or on the next working day by Isoelectric Focusing (IEF; Perkin Elmer) or High Performance Liquid Chromatograph (HPLC; Bio-Rad Variant Hemoglobin Testing System – Sickle Cell Short Program) (Campbell *et al.* 1999). All samples with an abnormal pattern on one system were further analyzed by the other system (IEF or HPLC).

Babies without hemoglobin A (Hb A), with a variant other than Hb S or Hb C, with a larger proportion of hemoglobin variant than Hb A and babies who had been transfused prior to blood sampling were recalled for repeat testing at 4-12 weeks of age. In some cases, parental samples were requested for a definitive hemoglobinopathy diagnosis, these were analyzed by IEF and HPLC (Bio-Rad  $\beta$ -Thal Short Program).

Molecular techniques were used to distinguish homozygous Hb S disease from Hb S/beta thalassemia and to identify rare hemoglobin variants. Briefly, genomic DNA was obtained from peripheral blood samples through a salting out procedure (Lahiri and Nurnberger 1991). HB S genotypes were investigated by PCR using specific primers for  $\beta$ -globin gene exon I (5'- GGC AGA GCC ATC TAT TGC TTA-3') and (5'- ACC TTA GGG TTG CCC ATA AC-3'). The amplified product was digested with *Dde I*, since the HB S mutation abolishes a recognition site for this enzyme at codon 6. The digestion fragments were analyzed on 2.5% agarose gels stained with ethidium bromide.

Amplification of the HBB, HBA2 and HBA1 genes were performed using gene-specific primers (Miranda *et al.* 1997; Moradkhani *et al.* 2009). DNA sequence analysis was performed with an automated sequencer (ABI 3100, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, or CEQ 8000, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

Allele frequencies were estimated by gene counting. Comparisons among gene frequencies were performed using the PEPI software program (Abramson 2004).

The project was previously approved by the Research Committee from Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) and developed integrally according the ethical principles in the resolution 196/96 of National Health Council.

## Results

Table 1 shows the prevalence of variant hemoglobins found in this study as well as those observed in other Brazilian regions (Figure 1). Among the 437,787 samples tested, 48 cases (0.01%) of sickle cell disorder (SCD) were diagnosed: 33 were homozygous for Hb S, 7 were compound heterozygous for Hb S and Hb C and 1 was compound heterozygous for Hb S and Hb D. Additionally, 7 neonates were compound heterozygous for Hb S and beta thalassemia and 1 neonate was homozygous for beta thalassemia. These results were confirmed using follow-up samples or family studies. The incidence of SCD in this population was 1:9,120. From these results, it was possible to estimate gene frequencies for the most common variants using the Hardy-

Weinberg equation. Allele frequencies were as follows: Hb S: 0.006, Hb C: 0.001 and Hb D: 0.0002. Although there was no deviation from those expected for Hb S frequencies, there were significant differences in genotype distribution and allele frequencies between different regions from Rio Grande do Sul State (Figure 1). These frequencies were 0.0026 in the northwest region and 0.0079, in Southeast region ( $P < 0.001$ ).

In 71 samples, rare hemoglobin variants were detected (alpha and beta globin-chain variants). We were able to identify the variant by DNA sequencing in 47 of these cases: 26 were due to mutations in the alpha-globin genes and 21 were due to mutations in the beta-globin gene. From these, 8 different hemoglobin variants were described for the first time in a Brazilian population. Twenty blood samples were not available for DNA studies and 4 cases could not be characterized. Familial studies were performed in 36 (77%) cases in which a rare variant was identified and parents were available for DNA studies. In all these cases the rare variant was also identified in one parent. Table 2 lists these variants, the number of samples in which they were detected and their occurrence in the world.

## Discussion

Brazilian studies have shown important regional differences related to prevalence of Hb S and Hb C, varying from 0.2% (South region) to 9.8% (Northeast region) (table 1; Figure 1). This reflects the diversity of racial origins and the different degrees of interethnic mixing in Brazil. The African component is lowest in the South (11%), while the highest values are found in the Northeast and Southeast (18–20%; Callegari-Jacques *et al.* 2003). Comparisons among hemoglobin surveys conducted in the southeastern region (Minas Gerais, Rio de Janeiro and São Paulo -Campinas; Table 1) showed higher frequencies of Hb S and Hb C in Rio de Janeiro and Minas Gerais than in Campinas, São Paulo. This last study presented lower Hb S and Hb C frequencies in relation to other locations from the same region (Brandalise *et al.* 2004), and similar to that observed in the southern population (present study). It has been estimated that between 1800 and the mid-20<sup>th</sup> century, about 4 million individuals entered the country, mainly from Portugal, Italy, Spain and Germany. This second immigration wave settled predominantly in São Paulo State and in the Brazilian southern region (Salzano and Freire-Maia 1970), therefore the similarity between the

results observed in Campinas which is in São Paulo State (Brandalise *et al* 2004) and in Rio Grande do Sul with lower Hb S and Hb C frequencies are not an unexpected finding.

When Hb S allele frequencies were compared in Rio Grande do Sul (Figure 1), a heterogeneous distribution was observed ( $p < 0.001$ ). These results indicate lower frequencies in the Northwest region (0.0026), an area in which the Italian contribution was most marked, and a higher incidence (0.0079) was found in the Southeast, a region in which there was a high concentration of slave labor during the colonial period (Cesar 1970).

Besides Hb S and Hb C, we also found 71 neonates heterozygous for rare variants (Table 2). It is important to note that occasionally the presumptive identification of hemoglobin variants using screening methods may be incorrect, since some variants are not discriminated from each other by current screening methods. Therefore, the presence of rare hemoglobin variants justifies the use of molecular biology techniques for correct identification and reflects the diverse ethnicities of the southern Brazilian population. Most of these rare hemoglobins were first described in Mediterranean and African populations, with whom the present-day Brazilians share recent common ancestors. They were probably introduced during the process of colonization but some, as Hb Woodville and Hb E-Saskatoon are found in a variety of different populations, including Vietnamese, Greek, Japanese, Scottish, Spaniards and Turkish (Giardine *et al.* 2007), and probably have arisen by independent mutation events in diverse populations, although we did not have any evidence of *de novo* mutations in the investigated sample.

The benefits of rare variant identification during neonatal screening are evident because some of them are clinically relevant: Hb Stanleyville II and Hb G-Phil when associated to  $-\alpha^{3.7}$  deletion results in a thalassemic phenotype; Hb J-Guantanamo presents a hemolytic mild anemia and Hb Beckman presents a chronic anemia, with microcytosis and reticulocytosis (Giardine *et al.* 2007). On the other hand, hemoglobins like Hb Shelby and Hb E-Saskatoon that are silent mutations, present the same IEF or HPLC pattern as the common clinically relevant Hb S or Hb C. Identification of these and other clinically significant hemoglobin variants can avert unnecessary future investigations and treatments, especially when hypochromia and microcytosis are present.

Non-selective hemoglobinopathy screening has ensured the diagnosis of SCD in the neonatal period, reducing morbidity and mortality in these patients and for this

reason has led to the introduction of screening programs in many parts of the world (Peres *et al.* 1995; Almeida *et al.* 2001; Bardakdjian-Michau *et al.* 2002; Boemer *et al.* 2006; Gulbis *et al.* 2006; Cela de Julian *et al.* 2007; King *et al.* 2007; Manu Pereira Mdel *et al.* 2007; Therrell and Adams 2007; Downing and Pollitt 2008; Michlitsch *et al.* 2009). At present, the Neonatal Screening Program of the public health system covers 77% of babies born in Rio Grande do Sul. Adding to those performed in private laboratories, the coverage reaches 95% of babies. In this study, 6.073 neonates heterozygous for Hb S and Hb C were identified, representing 94.9% of all results with altered hemoglobin patterns. The main benefits of heterozygous detection are family counseling and the identification of previously unknown at-risk couples (Henthorn *et al.* 2004).

Our results represent an extensive evaluation of neonatal screening for hemoglobinopathies performed in Rio Grande do Sul. Comparing these results with those obtained in other Brazilian regions, we observe a highly heterogeneous distribution. This knowledge is useful in healthcare planning and the targeting and allocation of resources to areas of most need.

## References

- Abramson JH (2004) WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiol Perspect Innov* 1:6.
- Adorno EV, Couto FD, Moura Neto JP, *et al.* (2005) Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cad Saude Publica* 21:292-298.
- Almeida AM, Henthorn JS, Davies SC (2001) Neonatal screening for hemoglobinopathies: the results of a 10-year programme in an English Health Region. *Br J Haematol* 112:32-35.
- Bardakdjian-Michau J, Guilloud-Bataillie M, Maier-Redelsperger M, *et al.* (2002) Decreased morbidity in homozygous sickle cell disease detected at birth. *Hemoglobin* 26:211-217.
- Boemer F, Vanbellinghen JF, Bours V, *et al.* (2006) Screening for sickle cell disease on dried blood: a new approach evaluated on 27,000 Belgian newborns. *J Med Screen* 13:132-136.
- Brandalise S, Pinheiro V, Gabetta CS, *et al.* (2004) Newborn screening for sickle cell disease in Brazil: the Campinas experience. *Clin Lab Haematol* 26:15-19.
- Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, *et al.* (2003) Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *Am J Hum Biol* 15:824-834.
- Campbell M, Henthorn JS, Davies SC (1999) Evaluation of cation-exchange HPLC compared with isoelectric focusing for neonatal hemoglobinopathy screening. *Clin Chem* 45:969-975.
- Cela de Julian E, Dulin Iniguez E, Guerrero Soler M, *et al.* (2007) Evaluation of systematic neonatal screening for sickle cell diseases in Madrid three years after its introduction. *An Pediatr (Barc)* 66:382-386.
- Cesar G (1970) *História do Rio Grande do Sul: Período Colonial*. Editora Globo, Porto Alegre.
- Davies SC, Cronin E, Gill M, *et al.* (2000) Screening for sickle cell disease and thalassaemia: a systematic review with supplementary research. *Health Technol Assess* 4:i-v, 1-99.

- de Araujo MC, Serafim ES, de Castro Jr WA, *et al.* (2004) Prevalence of abnormal hemoglobins in newborns in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. *Cad Saude Publica* 20:123-128.
- Diniz D, Guedes C, Barbosa L, *et al.* (2009) Prevalence of sickle cell trait and sickle cell anemia among newborns in the Federal District, Brazil, 2004 to 2006. *Cad Saude Publica* 25:188-194.
- Downing M, Pollitt R (2008) Newborn bloodspot screening in the UK--past, present and future. *Ann Clin Biochem* 45:11-17.
- Gaston MH, Verter JI, Woods G, *et al.* (1986) Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia. A randomized trial. *N Engl J Med* 314:1593-1599.
- Giardine B, van Baal S, Kaimakis P, *et al.* (2007) HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations: 2007 update. *Hum Mutat* 28:206.
- Gulbis B, Ferster A, Cotton F, *et al.* (2006) Neonatal hemoglobinopathy screening: review of a 10-year programme in Brussels. *J Med Screen* 13:76-78.
- Henthorn JS, Almeida AM, Davies SC (2004) Neonatal screening for sickle cell disorders. *Br J Haematol* 124:259-263.
- Higgs DR, Weatherall DJ (2009) The alpha thalassaemias. *Cell Mol Life Sci* 66:1154-1162.
- King L, Fraser R, Forbes M, *et al.* (2007) Newborn sickle cell disease screening: the Jamaican experience (1995-2006). *J Med Screen* 14:117-122.
- Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.
- Lees CM, Davies S, Dezateux C (2000) Neonatal screening for sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Rev*:CD001913.
- Lobo CL, Bueno LM, Moura P, *et al.* (2003) Neonatal screening for hemoglobinopathies in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Panam Salud Publica* 13:154-159.

- Manu Pereira Mdel M, Cabot A, Martinez Gonzalez A, *et al.* (2007) Neonatal screening of hemoglobinopathies and G6PD deficiency in Catalonia (Spain). Molecular study of sickle cell disease associated with alpha thalassemia and G6PD deficiency]. *Med Clin (Barc)* 129:161-164.
- Michlitsch J, Azimi M, Hoppe C, *et al.* (2009) Newborn screening for hemoglobinopathies in California. *Pediatr Blood Cancer* 52:486-490.
- Miranda S, Fonseca S, Figueiredo M, *et al.* (1997) Hb Köln [a2b2 98 (FG) Val-Met] identified by DNA analysis in a Brazilian family. *Braz J Gen* 20:745-748.
- Moradkhani K, Prehu C, Old J, *et al.* (2009) Mutations in the paralogous human alpha-globin genes yielding identical hemoglobin variants. *Ann Hematol* 88:535-543.
- Paixão MC, Cunha Ferraz MH, Januario JN, *et al.* (2001) Reliability of isoelectrofocusing for the detection of Hb S, Hb C, and HB D in a pioneering population-based program of newborn screening in Brazil. *Hemoglobin* 25:297-303.
- Peres MJ, Romao L, Carreiro H, *et al.* (1995) Molecular basis of alpha-thalassemia in Portugal. *Hemoglobin* 19:343-352.
- Salzano FM, Freire-Maia N (1970) Problems in human biology. A study of Brazilian populations. Wayne State University Press, Detroit, USA.
- Serjeant GR (2000) Screening for sickle-cell disease in Brazil. *Lancet* 356:168-169
- Therrell BL, Adams J (2007) Newborn screening in North America. *J Inherit Metab Dis* 30:447-465.
- Wagner SC, Pereira C, Castro SM (2006) Association of Hb Shelby with Hb S in the south of Brazil. *Haematologica* 91:1141-1142.
- Watanabe AM, Pianovski MA, Zanis Neto J, *et al.* (2008) Prevalence of hemoglobin S in the State of Parana, Brazil, based on neonatal screening. *Cad Saude Publica* 24:993-1000.
- Weatherall DJ, Provan AB (2000) Red cells I: inherited anaemias. *Lancet* 355:1169-1175.



Table 1: Frequency of major haemoglobin phenotypes in Brazilian populations

<b>Population</b>	<b>Sample size N</b>	<b>SCD N (%)</b>	<b>Hb CC N (%)</b>	<b>Hb Trait n (%)</b>	<b>Reference</b>
Natal – Rio Grande do Norte (Northeast)	1940	Hb SS: 1 (0.05%)		Hb AS: 29 (1.5%) Hb AC: 6 (0.31%)	(de Araujo et al. 2004)
Salvador-Bahia (Northeast)	502	Hb SS: 1 (0.2%) Hb SC: 4 (0.8%)	-	Hb AS: 57 (9.8%) Hb AC: 38 (6.5%)	(Adorno et al. 2005)
Brasília –Distrito Federal	116,271	Hb SS: 109 (0.09%)		Hb AS: 3,760 (3.2%)	(Diniz et al. 2009)
Minas Gerais (Southeast)	605,419	Hb SS: 486 (0.08%)		Hb AS: 3.2% Hb AC: 1.3%	(Serjeant 2000)
Minas Gerais (Southeast)	128,326	Hb SS: 46 (0.04%) Hb SC: 37 (0.03%) Hb S/beta thal: 4 (0.01%)	15-0,01%	Hb AS: 4,221 (3.29%) Hb AC: 1,558 (1.21%)	(Paixão et al. 2001)
Rio de Janeiro (Southeast)	99,260	Hb SS: 62 (0.6%) Hb SC: 18 (0.02%) Hb SD 3 (0,01%)	1-0,01%	Hb AS: 3,933 (3.96%) Hb AC: 588 (0.59%) Hb AD: 142 (0.14%)	(Lobo et al. 2003)
Campinas- São Paulo (Southeast)	281,884	Hb SS: 29 (0.01%) Hb SC: 26 (0.009%) Hb S/beta thal: 4 Hb SC: 26 (0.009%)	1	Hb AS: 5,197 (1.98%) Hb AC: 1,615 (0.57%)	(Brandalise et al. 2004)
Paraná (South)	548,810	Hb SS: 12 (0.002%) Hb S/beta thal: 15 (0.003%)		Hb AS: 8,321 (1.52%)	(Watanabe et al. 2008)
Rio Grande do Sul (South)	437,787	Hb SS: 33 (0.01%) Hb SC: 7 (0.001%) Hb SD: 1 (0.0002%) Hb S/beta thal: 7 (0.0016%)		Hb AS: 5,236 (1.19%) Hb AC: 837 (0.19%) Hb AD: 199 (0.05%) Rarer variants: 71 (0.02%)	Present study

Table 2: List of rare  $\alpha$  and  $\beta$  chain identified and their occurrence in the world

Hemoglobin	N	$\alpha$ Mutation	Occurrence in the world (Giardine et al. 2007)
<i>Hb Woodville</i>	3	$\alpha 2$ or $\alpha 1$ (6)	Vietnamese
<i>Hb Chad</i>	1	$\alpha 2$ or $\alpha 1$ (23)	African, Chinese, Japanese
Hb Hasharon	2	$\alpha 2$ (47)	Ashkenazi Jews, Italian
<i>Hb G-Phil</i>	4	$\alpha 2$ or $\alpha 1$ (68)	African, Chinese, Italian
Hb G-Pest	4	$\alpha 2$ or $\alpha 1$ (74)	Hungarian
Hb Stanleyville II*	12	$\alpha 2$ or $\alpha 1$ (78)	African
<b>Total</b>	<b>26</b>		
Hemoglobin	N	$\beta$ Mutation	
<i>Hb E-Saskatoon**</i>	11	$\beta$ (22)	Greek, Japanese, Scottish, Turkish, Spaniards
Hb Osu-Christiansborg	1	$\beta$ (52)	African, Ghanaian, Greek, Iranian
<i>Hb Richmond</i>	1	$\beta$ (102)	African
<i>Hb O-arab</i>	2	$\beta$ (121)	African-American, Arabian, Egyptian, Gypsy, Pomak
Hb D Los Angeles	1	$\beta$ (121)	Australian, Chinese, Dutch, English, Greek, Pakistani
Hb J-Guantanamo	1	$\beta$ (128)	Benin, Chilean, Chinese, Cuban, Japanese
Hb Shelby***	1	$\beta$ (131)	African
<i>Hb Beckman</i>	1	$\beta$ (135)	African
<i>Hb Hope</i>	2	$\beta$ (136)	African, Cuban, Japanese, Laotian, Thai
<b>Total</b>	<b>21</b>		

\* 1 case found compound heterozygous with Hb C

\*\* 1 case found compound heterozygous with beta thalassemia trait

\*\*\* Found compound heterozygous with Hb S (Wagner et al. 2006)

Variants in italics are describe for the first time in Brazilian Population



Figure 1: Map of Brazil indicating its five socio-geographic regions (separated by heavy lines), as well as the states' contours (lighter lines) and the locations of the cities from other studies. Also shown is a map of Rio Grande do Sul indicating Hb S gene frequencies at Northwest and Southeast regions

Capítulo III

**High prevalence of Hb E-Saskatoon in Brazilians**

---

Manuscrito em preparação a ser submetido à revista Clinica Chimica

Acta

## High prevalence of Hb E-Saskatoon in Brazilians

Keywords: Hb E-Saskatoon, Hemoglobinopathies,  $\beta$  globin haplotypes

**Sandrine C. Wagner,<sup>1,2</sup> Juliana Dal-Ri Lindenau,<sup>1</sup> Simone M. de Castro,<sup>3</sup> Tatiana P. Gonzalez,<sup>1</sup> Ana Paula Santin,<sup>3</sup> Carina F. Zaleski,<sup>3</sup> Laura A. Azevedo,<sup>3</sup> Thaís Helena da Silveira,<sup>2</sup> Sidney E. B. dos Santos,<sup>4</sup> Ândrea K. C. R. dos Santos,<sup>4</sup> Mara H. Hutz,<sup>1</sup>**

*1- Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.*

*2- Centro Universitário FEEVALE, Novo Hamburgo, Brazil.*

*3- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.*

*4- Laboratório de Genética Humana e Médica, Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil.*

Corresponding author:

Mara H. Hutz

Departamento de Genética

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av Bento Gonçalves, 9500

Caixa Postal 15053

91501-970 - Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: 55-51-33086720

FAX: 55 -51-33087311

E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

## Abstract

**Background:** Hb E-Saskatoon [ $\beta$ 22 (Glu→Lys) GAA→AAA] is a rare, non pathological  $\beta$ -globin variant first described in a Canadian woman of mixed Scots and Dutch origin, but that is now found in several populations. The most frequently used methods for diagnosis of hemoglobinopathies are electrophoretic and/or chromatography techniques. Hb E-Saskatoon shows similar electrophoretic and elution pattern as Hb C/E and Hb S in IEF and HPLC systems, respectively.

**Methods:** Blood samples were analyzed by IEF and HPLC using commercial kits. Hb E-Saskatoon was confirmed by amplification of the HBB gene, followed by sequence analysis. Haplotypes of  $\beta$ -globin gene were determined by polymerase chain reaction (PCR), followed by digestion with specific restriction enzymes. For analysis and estimation of individual ancestry, DNA samples were typed for the 48 biallelic INDELS by means of three 16-plex PCR amplifications.

**Results:** IEF pattern was similar to Hb C/E (pI: 7.59-7.65) and HPLC results showed an elution in the Hb S window (RT: 4.26 - 4.38). Direct DNA sequencing of the amplified  $\beta$ -globin gene showed a mutation at codon 22 (GAA→AAA) corresponding to Hb E-Saskatoon. Haplotype 2 (+----) was associated with Hb E-Saskatoon and individuals showed a high degree of European contribution (>80.0%).

**Conclusion:** The use of different methodological approaches is necessary for correct identification of some abnormal hemoglobin as Hb E-Saskatoon. Indeed, haplotype analysis showed haplotype 2 in Brazilian carriers of Hb E-Saskatoon, differently than previously described, suggesting at least two genetic origins for this abnormal hemoglobin.

## 1. Introduction

Hb E-Saskatoon [ $\beta$ 22 (Glu $\rightarrow$ Lys) GAA $\rightarrow$ AAA] is a rare, non pathological  $\beta$ -globin variant described by Vella et al. in a Canadian woman of mixed Scots and Dutch origin [1]. Family studies showed that this new hemoglobin was inherited from the Scottish father. Since then, this variant has been detected in Scotland, Spain, Turkey, Japan and Greece. It has been found in heterozygous and homozygous forms, in pregnant women, and in association with  $\beta$ -thalassemia, Hb S and Hb Lepore-Baltimore [2-11].

The laboratory diagnosis of hemoglobinopathies and thalassemias frequently uses electrophoretic and/or chromatography approach. This includes alkaline and acid hemoglobin electrophoresis, isoelectric focusing (IEF) and cation exchange high performance liquid chromatography (HPLC). IEF and HPLC are the most widely used methods in screening programs, and are indeed the most common in Brazil. These methods are capable of separating common hemoglobin variants, such as hemoglobin A (Hb A), Hb F, Hb A<sub>2</sub>, Hb F and Hb C. In some cases, hemoglobins variants show identical or similar pattern of mobility or retention time (RT) in electrophoresis and HPLC, respectively. Hb E-Saskatoon has the same electrophoretic properties as Hb E ( $\beta$ 26(Glu $\rightarrow$ Lys)) and for this reason it is necessary to apply others methods as well as DNA studies for correct identification.

The  $\beta$  globin gene cluster has been largely employed in population studies for different approaches such as historical, anthropological and clinical correlations (for example in sickle cell disease and  $\beta$  thalassemia) [12-18]. Only two studies have been performed in Hb E-Saskatoon carriers to determine the associated haplotype. Both of them in Turkey subjects showed the presence of haplotype 6 [19], suggesting a single origin for this hemoglobin in that population [3, 7].

In Brazil, hemoglobinopathies investigations were incorporated into the National Brazilian Neonatal Screening Program in 2001. Different hemoglobin variants have been reported since, but Hb E-Saskatoon was identified in the South region only by our group [20]. According to our analysis, besides the observation of the most frequent hemoglobin variants Hb S and Hb C, we identified eleven cases of Hb E-Saskatoon. Diagnosis of this hemoglobin was confirmed with DNA sequence analysis after IEF and

HPLC techniques. In this study we aimed to describe electrophoretic and/or chromatographic properties of Hb E-Saskatoon in these samples in order to elucidate this unusual result.

## 2. Materials and Methods

This study was performed on nine unrelated individuals previously identified as heterozygous for Hb E-Saskatoon (two sample's individuals were not available for this study) [20]. The project was approved by the Research Committee from Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) and developed integrally according the ethical principles in the resolution 196/96 of National Health Council.

Samples of dried blood spots' (DBS) heel prick from neonates were tested by IEF (Perkin Elmer) or HPLC (Bio-Rad Variant Hemoglobin Testing System – Sickle Cell Short Program) [21]. All samples with an abnormal pattern on one system were further analyzed by the other system (IEF or HPLC). In samples with rare hemoglobin, baby and relative's blood sample were required and molecular techniques were applied to identify the hemoglobin variant.

Blood samples were collected in vacuum tubes, using EDTA as anticoagulant. Samples were re-analyzed by IEF (Perkin Elmer) and HPLC (Bio-Rad Variant™-Beta-Thal Short Program) [21]. Genomic DNA was obtained from peripheral blood samples through a salting out procedure [22]. Hb E-Saskatoon was confirmed by amplification of the HBB gene, using gene-specific primers [23] and DNA sequence analysis was performed with an automated sequencer (ABI 3100, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, or CEQ 8000, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).  $\beta$ -globin gene haplotypes were determined by polymerase chain reaction (PCR), using methods and conditions previously published [12, 24]. Eight polymorphic restriction sites were analyzed (*HincII*- $\epsilon$ , *HindIII*-G $\gamma$ , *HindIII*-A $\gamma$ , *HincII*- $\psi\beta$ , *HincII*-3' $\psi\beta$ , *HinfI*5' $\beta$ , *Rsa*- $\beta$ , *BamI*-3' $\beta$ ). Haplotypes were derived using the Multiple Locus Haplotype Analysis program [25]. For analysis and estimation of individual ancestry, DNA samples were typed for the 48 biallelic INDELs by means of three 16-plex PCR amplifications as previously described [26].



### 3. Results and Discussion

A summary of ancestry proportions, haplotypes, IEF and HPLC results, besides family recurrence is presented in Table 1. All adult individuals showed normal hematological values (data not shown) indicating that Hb E-Saskatoon seems to be an innocuous variant. These results are in agreement with previous findings by other authors, even during pregnancy [9] or in association with Hb S [23].

IEF revealed the presence of a variant migrating next to the pI of Hb C/E (7.59 - 7.65) and HPLC showed a variant eluting on Hb S window (RT: 4.26 - 4.38). The identification of Hb E-Saskatoon was obtained by DNA sequencing. It is important to note that occasionally the presumptive identification of hemoglobin variants using those screening methods may be incorrect. In the case of Hb E-Saskatoon is necessary molecular analysis, since it is not discriminated by current screening methods and may cause misinterpretation and false Hb C or Hb S trait.

Eight restriction sites were analyzed for each of the heterozygous Hb E-Saskatoon carrier. According to the results, the obtained haplotype [+----++] was associated with Hb E-Saskatoon. Although all individuals analyzed are from unrelated families, they share the same  $\beta$  haplotype corresponding to haplotype 2 [19] indicating a single origin for Hb E-Saskatoon in Brazilian carriers. Haplotype 2, found in this study, is the most common in Eurasians [16] which is in line with the admixture proportions where the European contribution was high, ranging from 0.72 to 0.94. The only two other haplotype studies performed in Hb E-Saskatoon carriers, both in Turkish individuals, showed this mutation was in linkage disequilibrium with haplotype 6 [3, 7], the second most prevalent haplotype in Eurasian populations [16]. These results suggest that the Hb E-Saskatoon mutation was originated in at least two separate mutational events. Based on historical data on the early European colonization of Rio Grande do Sul state, mainly of Spanish and Portuguese individuals [27], and the admixture study performed, we can speculate that the individuals with Hb E-Saskatoon identified here have probably an Iberic origin, once this hemoglobin have been reported in Spaniards [2, 4]. Identification of the haplotypes in individuals with Hb E-Saskatoon has a great significance from an historical and anthropological point of view and studies performed in individuals from other countries, as Scotland and Spain, principally, would be helpful to elucidate the other possible origins for this rare hemoglobin.

Besides Hb E-Saskatoon in heterozygous, we detected one baby compound Hb E-Saskatoon and IVS1-6, a  $\beta^+$  thalassemia mutation (Table 1). This mutation have been describe in Brazilian population showing an uneven distribution [28-30]. This association (Hb E-Saskatoon and IVS1-6) was been previously describe during a familiar study and showed a hematological picture as seen as for a classical  $\beta$ -thalassemia trait [5].

As for the laboratory significance, our data shows that the use of a single procedure, either IEF or HPLC, for hemoglobin investigation can lead to false results, which can be avoided if an additional method is performed on the abnormal samples. In some cases, a molecular analysis must be added for correct identification.

In regards to epidemiology, until now, Hb E-Saskatoon was described only in the South Brazilian region. We believe that Hb E-Saskatoon is being erroneously classified because neonatal screening is performed today using habitually only one methodological approach. For a heterogeneous population as Brazilian's, we suggest application of both methodologies during neonatal screening to avoid misinterpretation, false hemoglobin variant diagnose, besides unnecessary follow up of asymptomatic carriers.

**Acknowledgments:** The authors thank the financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Programa de Apoio de Núcleos de Excelência (PRONEX, Brazil), Institutos do Milênio (CNPq, Brazil), and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## References

- [1] Vella F, Lorkin PA, Carrell RW, Lehmann H. A new hemoglobin variant resembling hemoglobin E. Hemoglobin E Saskatoon: beta-22 Glu replaced by Lys. *Can J Biochem* 1967; 45:1385-1391.
- [2] Ropero P, Murga MJ, Gonzalez FA, et al. The first case of Hb E-Saskatoon associated with Hb Lepore-Baltimore found in Spain. *Hemoglobin* 2005; 29:215-219.
- [3] Birben E, Oner R, Oner C, Gumruk F, Gurgey A, Altay C. Homozygosity for Hb E-Saskatoon [ $\beta$ 22(B4)Glu-->Lys] in a Turkish patient. *Hemoglobin* 2001; 25:409-415.
- [4] Gonzalez Redondo JM, Sicilia A, Murga MJ, Kutlar A, Wilson JB, Huisman TH. Hb E-Saskatoon or alpha 2 beta 2(22)(B4)Glu---Lys in a Spanish family. *Hemoglobin* 1987; 11:35-38.

- [5] Gurgey A, Sipahioglu M, Aksoy M. Compound heterozygosity for Hb E-Saskatoon or alpha 2 beta 2(22)(B4)Glu----Lys and beta-thalassemia type IVS-I-6 (T----C). *Hemoglobin* 1990; 14:449-451.
- [6] Igarashi Y, Matsuzaki S, Kanou N, et al. The first case of Hb E-Saskatoon [alpha 2 beta(2)22(B4)Glu-->Lys] in a Japanese male in Asia. *Hemoglobin* 1995; 19:403-406.
- [7] Öztürk O, Atalay A, Kösel A, et al. Beta globin gene cluster haplotypes of abnormal hemoglobins observed in Turkey. *Turkish Journal of Hematology* 2007; 24:146-154.
- [8] Theodoridou S, Plata E, Karababa P, Loutradi A, Vyzantiadis T, Manitsa A. The first case of a compound heterozygosity for Hb E-Saskatoon and HbS. *Haematologica* 2003; 88:ECR08.
- [9] Theodoridou S, Vyzantiadis TA, Theodoridis T, et al. Hemoglobin E-Saskatoon and pregnancy: report of two cases. *J Obstet Gynaecol Res* 2006; 32:346-348.
- [10] Tills D, Muir V, Warlow A, et al. The occurrence of Hb E Saskatoon in Scotland. *Hum Genet* 1976; 33:179-180.
- [11] Welch SG. Haemoglobin E Saskatoon beta 22 Glu replaced by Lys in the Shetland Islands. *J Med Genet* 1976; 13:477-478.
- [12] Bevilaqua LR, Mattevi VS, Ewald GM, et al. Beta-globin gene cluster haplotype distribution in five Brazilian Indian tribes. *Am J Phys Anthropol* 1995; 98:395-401.
- [13] Cao A, Galanello R, Rosatelli MC. Genotype-phenotype correlations in beta-thalassemias. *Blood Rev* 1994; 8:1-12.
- [14] Figueiredo MS, Kerbauy J, Goncalves MS, et al. Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. *Am J Hematol* 1996; 53:72-76.
- [15] Kulozik AE, Wainscoat JS, Serjeant GR, et al. Geographical survey of beta S-globin gene haplotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation. *Am J Hum Genet* 1986; 39:239-244.
- [16] Mattevi VS, Fiegenbaum M, Salzano FM, et al. Beta-globin gene cluster haplotypes in two North American indigenous populations. *Am J Phys Anthropol* 2000; 112:311-317.
- [17] Pagnier J, Mears JG, Dunda-Belkhodja O, et al. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81:1771-1773.
- [18] Wainscoat JS, Bell JI, Thein SL, et al. Multiple origins of the sickle mutation: evidence from beta S globin gene cluster polymorphisms. *Mol Biol Med* 1983; 1:191-197.
- [19] Long JC, Chakravarti A, Boehm CD, Antonarakis S, Kazazian HH. Phylogeny of human beta-globin haplotypes and its implications for recent human evolution. *Am J Phys Anthropol* 1990; 81:113-130.
- [20] Wagner SC, Castro SM, Gonzalez TP, et al. Neonatal screening for hemoglobinopathies: the results of a public health system in south Brazil. *Genet Test* 2010; Submitted.
- [21] Campbell M, Henthorn JS, Davies SC. Evaluation of cation-exchange HPLC compared with isoelectric focusing for neonatal hemoglobinopathy screening. *Clin Chem* 1999; 45:969-975.
- [22] Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19:5444.

- [23] Miranda S, Fonseca S, Figueiredo M, Yamamoto M, Grotto H, Saad S. Hb Köln [a2b2 98 (FG) Val-Met] identified by DNA analysis in a Brazilian family. *Braz J Gen* 1997; 20:745-748.
- [24] Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. *Am J Hematol* 1989; 32:66-69.
- [25] Long JC, Multiple Locus Haplotype Analysis. Software and documentation distributed by the author. Bethesda: Laboratory of Neurogenetics, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, National Institutes of Health, 1999.
- [26] Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat* 2010; 31:184-190.
- [27] Marrero AR, Leite FP, Carvalho BA, et al. Heterogeneity of the genoma ancestry of individuals classified as white in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Am J Hum Biol* 2005; 17:496-506.
- [28] Araujo AS, Silva WA, Leao SA, et al. A different molecular pattern of beta-thalassemia mutations in northeast Brazil. *Hemoglobin* 2003; 27:211-217.
- [29] Reichert VC, de Castro SM, Wagner SC, de Albuquerque DM, Hutz MH, Leistner-Segal S. Identification of beta thalassemia mutations in South Brazilians. *Ann Hematol* 2008; 87:381-384.
- [30] Bertuzzo CS, Sonati Mde F, Costa FF. Hematological phenotype and the type of beta-thalassemia mutation in Brazil. *Braz J Gen* 1997; 20:319-321.

Table 1: Summary of the ancestry, haplotypes, IEF and HPLC results, besides family recurrence

Sample	Ancestrality			Haplotype <sup>a</sup>	IEF pattern (pI)	HPLC pattern (RT)	Family recurrence
	Euro	African	Amerindio				
463	ND	ND	ND	2	7.63	4.36	M
514	0.897	0.054	0.049	2	7.63	4.36	NA
660	0.682	0.025	0.293	2	7.64	4.36	M
707	0.925	0.011	0.064	2	7.63	4.38	M
767	0.837	0.082	0.080	2	7.61	4.36	M
807	0.817	0.050	0.134	2	7.65	4.38	F
811	0.917	0.020	0.063	2	7.65	4.38	M
1076*	0.890	0.030	0.081	2	7.59	ND	M
1440	0.851	0.049	0.099	2	ND	4.21	M

<sup>a</sup>: Haplotype based on Long's designation [19]

\*In association with IVS1-6

M: mother; F: father

ND: not determined

NA: information not available

pI: isoelectric point

RT: retention time

Capítulo IV

**Prevalence of  $\alpha$ -thalassemia in south Brazil: importance to  
microcytic anemia diagnosis**

---

Manuscrito submetido à revista Genetics and Molecular Biology

**Prevalence of  $\alpha$ -thalassemia in south Brazil: importance to microcytic anemia diagnosis.**

**S. C. Wagner<sup>1,2</sup>, S. M. de Castro<sup>3</sup>, T. P. Gonzalez<sup>1</sup>, A. P. Santin<sup>3</sup>, L. Filippon<sup>3</sup>, C. F. Zaleski<sup>3</sup>, L. A. Azevedo<sup>3</sup>, B. Amorin<sup>2</sup>, S. M. Callegari-Jaques<sup>1</sup>, M. H. Hutz<sup>1</sup>**

1- Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

2- Centro Universitário FEEVALE, Novo Hamburgo, RS, Brasil.

3-Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Correspondence:

M. H. Hutz

Departamento de Genética

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av Bento Gonçalves, 9500

Caixa Postal 15053

91501-970 - Porto Alegre, RS, Brasil

Fone: +55-51-33086720

FAX: +55 -51-33087311

E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

**Running title:  $\alpha$ -thalassemia in south Brazil**

### **Abstract**

Alpha thalassemia has not been systematically investigated in Brazil. In the present study a sample of 493 unrelated individuals from the Brazilian southernmost state Rio Grande do Sul was screened for deletional forms of alpha thalassemia. Among them, 101 presented microcytic anemia (MCV<80 fl) and a normal hemoglobin pattern (Hb A<sub>2</sub><3,5% e Hb F<1%). The  $-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ,  $-\alpha^{20.5}$ ,  $--^{SEA}$  and  $--^{MED}$  deletions were investigated but only the  $-\alpha^{3.7}$  allele was observed. The  $-\alpha^{3.7}$  allele frequency observed in Brazilians of European and African ancestry was 0.02, 0.12 respectively whereas in individuals with microcytosis this figure was 0.20. Alpha-thalassemia prevalence was significantly higher in individuals with microcytosis than in healthy individuals independently of ethnic group (p=0.001). Significant differences among  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ,  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ , beta-thalassemia trait and healthy subjects groups were observed in hematological parameters. The present data suggest that  $\alpha$ -thalassemia is an important cause of microcytosis and mild anemia in Brazilians.

**Keywords:** hemoglobin; alpha thalassemias genotypes; microcytosis; Brazilian population



## INTRODUCTION

The thalassemias are a diverse group of microcytic hemolytic anemias that are characterized by defective synthesis of one or another globin chain (Kazazian, 1990). Alpha thalassemia is caused by deficient synthesis of  $\alpha$  chains. The molecular lesions can be categorized into  $\alpha^+$  or  $\alpha^0$  defects, depending on whether they partially or completely abolish  $\alpha$ -globin chain production, respectively (Higgs and Weatherall, 2009).

The spectrum of mutations that underlie the  $\alpha$  thalassemias vary widely in different populations, indicating that they have almost certainly arisen locally and that their frequency has expanded by natural selection together with some degree of founder effect and gene drift. There is strong evidence that selection reflects past or present exposure to malaria. Overall, the  $\alpha$ -thalassemias follow a similar distribution to the  $\beta$ -thalassemias, extending from sub-Saharan Africa through the Mediterranean region and Middle East, to the Indian sub-continent and East and South East Asia (for a review see Higgs and Weatherall, 2009). The most common  $\alpha^+$ -thalassemia deletional alleles are  $-\alpha^{3.7}$  and  $-\alpha^{4.2}$ . The  $-\alpha^{3.7}$  allele has been observed all over the world, with higher frequencies in some African and Mediterranean populations. The  $-\alpha^{4.2}$  is most common in Asian countries although it also occurs in Mediterranean populations (Flint *et al.*, 1993). In Mediterraneans the  $-\alpha^{20.5}$  and  $--^{Med}$  alleles are also frequent (Kattamis *et al.*, 1996). In general non-deletion  $\alpha$ -thalassemias are less frequent and have limited geographical distributions when compared to the deletional forms of the disease (Higgs and Weatherall, 2009).

The Brazilian population was formed by successive migratory waves. The Amerindian people were occupying the Brazilian territory when the Portuguese arrived in 1500, and colonized the country. Between the 16<sup>th</sup> and the 19<sup>th</sup> centuries Africans were brought to Brazil as slaves, and besides the Portuguese, other migratory waves occurred in the 19<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> centuries, mainly from Italy, Germany and Spain (Salzano and Bortolini, 2002). All these migratory events have contributed to the formation of a multiethnic highly admixed population. This heterogeneity was documented in several genetic studies, using either uniparental or autosomal markers, which demonstrated a typical although non-uniform triethnic (European+African+Amerindian) pattern for the Brazilian population gene pool. Southern populations presented lower levels of African and higher degrees of European contributions when compared to other Brazilian groups

(Salzano and Bortolini, 2002; Callegari-Jacques *et al.*, 2003; Parra *et al.*, 2003; Zembrzuski *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2009). Migration of people mainly from sub-Saharan Africa and from the Mediterranean region introduced the thalasseмии in the present-day Brazilian population, since no evidence for autochthonous thalasseмии were observed in Brazil (Zago *et al.*, 1995).

Although several investigations reported the prevalence of hemoglobin disorders in Brazil, alpha thalassaemia has not been systematically investigated. Only few previous studies screened Brazilians to estimate the prevalence of alpha thalassaemia trait in the general population. Sonati *et al.* observed a prevalence of 21% heterozygous  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  and 2% homozygous  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$  genotypes in African Brazilian blood donors from the southeast (Sonati *et al.*, 1991). In another survey in a northeastern highly admixed population the  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  genotype was detected in 20% of 514 newborn babies while the homozygous genotype was seen in 2.5% of the children investigated (Adorno *et al.*, 2005). In a recent investigation, the frequency of the  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  genotype observed in a healthy northern admixed Brazilian population was 7% (Souza *et al.*, 2009). The present study was carried out to determine the prevalence of  $\alpha$ -thalassaemia in southern Brazilians from African and European ancestry as well as in a sample of patients with mild anemia, microcytosis, and normal iron status from the same population.

## MATERIALS AND METHODS

A total of 493 unrelated individuals were included in this study. The largest sample was composed of 392 healthy individuals (191 African Brazilians and 201 Brazilians of European ancestry) recruited during their routine blood determinations at the Pharmacy School Laboratory of the Federal University of Rio Grande do Sul among those who came from several city health centers for free routine blood determinations. The sample collection was performed between 2001-2002. The remaining 101 subjects were recruited among those referred to the Hemoglobin Center of the same School to investigate microcytosis without iron deficiency. The Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul approved the study protocol. All participants of the study were able to read the informed consent form and gave written informed consent.

The blood samples were collected in vacuum tubes, using EDTA as anticoagulant. The hematological indices were obtained with an automated counter (ABX Micros 60, Horiba Group, Japan). For those subjects referred due to microcytosis (MCV<80 fl), the inclusion criteria were a previous diagnosis compatible with the possible presence of  $\alpha$ -thalassemia based on a normal Hb profile evaluated by high-performance liquid chromatography system (HPLC- Bio-Rad Variant<sup>TM</sup>-Beta-Thal Short Program) and/or isoelectric focusing system (IEF-Perkin-Elmer). All of them presented Hb A<sub>2</sub><3.5% and Hb F<1%. All patients had normal iron status and/or clinical suspicion of  $\alpha$ -thalassemia (no answer to iron therapy).

Genomic DNA was obtained from peripheral blood samples through a salting out procedure (Lahiri and Nurnberger, 1991). The  $\alpha$ -globin genotypes were screened by polymerase chain reaction (PCR) in multiplex reactions as described by Tan et al. (Tan *et al.*, 2001) or in single reactions with primers and protocols described by Dode *et al.* (Dode *et al.*, 1993). The genotypes were determined after electrophoresis of the amplicons in 1% agarose gels containing ethidium bromide, using a 100 bp ladder to score the band sizes, a known heterozygous sample was also used as a positive control in all gels.

Genotypic distribution and allele frequencies were estimated by gene counting. Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was tested by chi-square. The determination of statistically significant differences in genotypic and allele frequencies between groups was assessed by chi-square or, when appropriate, by Fisher's exact test

using the WinPEPI program (Abramson, 2004). A significance level of 0.05 was accepted as significant.

Hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct) and red blood cells (RBC) values were adjusted for age and sex. The adjusted variables, as well as mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), were compared among  $\alpha$ -genotypes, beta-thalassemia trait carriers (Reichert *et al.*, 2008) and healthy individuals using Multivariate Analysis of Variance (MANOVA) to account for the correlation between these hematological indices. The SNK procedure was used for the subsequent pairwise multiple comparisons between groups, except for red blood cells, where Tamhane's test was used to account for heterocedasticity. These tests were performed using SPSS v12.0.

## RESULTS

Allele and genotype frequencies for healthy and patient samples are shown in Table 1. All patients with microcytosis were screened for  $-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ,  $-\alpha^{20.5}$ ,  $--^{SEA}$  and  $--^{MED}$  deletions but only the  $-\alpha^{3.7}$  allele was observed. Since this allele was the only one observed in microcytic patients, the investigation in healthy subjects was restricted to  $-\alpha^{3.7}$  deletion. Among 202 euro-descendants, 4.5% showed the  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ , while among 191 Southern African Brazilians, 23.1% presented  $\alpha$ -thalassemia: 21% were heterozygous ( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ) and 1.6% were homozygous ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ) for  $-\alpha^{3.7}$  deletion genotype. Among 101 subjects with mild anemia and microcytosis, 31.7% presented  $\alpha$ -thalassemia, 23 (22.8%) were heterozygous for the  $-\alpha^{3.7}$  deletion and 9 (8.9%) were homozygous ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ). The allele frequency observed was 0.02, 0.12 and 0.20 for Euro and African Brazilians and patients with microcytic anemia, respectively. The frequency of  $\alpha$ -thalassemia in the last group is significantly higher from those observed in healthy individuals independently of ethnic group ( $p=0.001$ ).

Analysis of blood indices in alpha-thalassemia genotypes, beta-thalassemia trait and healthy individuals are shown in Table 2. Significant differences among  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ,  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ , beta-thalassemia trait and healthy groups of individuals were obtained in the multivariate analyses for the hematological parameters investigated (Pillai's trace for comparison between genotypes:  $F=38,58$ ;  $P<0,001$ ). In the subsequent univariate analysis, Hb, Hct and MCHC clearly separated healthy individuals from patients, but no difference between these last subjects could be identified. On the other hand, MCV and MCH discriminated between the four groups of individuals, and a trend could be identified from higher values in healthy individuals to lower in beta-thalassemia trait patients,  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  and  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$  presenting intermediate figures. Controls and  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  presented similar RBC numbers ( $4.6 \times 10^{12}/L$ ), which were significantly lower than those of beta-thalassemia trait carriers;  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$  presented an intermediate level that could not be distinguished statistically from the other means.

## Discussion

Microcytic hypochromic anemia is a common hematologic condition observed by physicians in clinical practice. The results of this study showed that alpha-thalassemia, represented by  $-\alpha^{3.7}$  deletion, perform a common cause of this hematological alteration (31.7% among microcytic patients). These results concur with those reported by Borges *et al.* in a southeastern Brazilian population where  $\alpha$ -thalassemia explained about 50% of the cases with microcytosis (Borges *et al.*, 2001). Other studies that tested patients with microcytosis with a similar approach as the one used in the present study reported a proportion of cases with  $\alpha$ -thalassemia between 25 and 80% (Foglietta *et al.*, 1996; Sivera *et al.*, 1997; Bergeron *et al.*, 2005; Di Bella *et al.*, 2006; Lafferty *et al.*, 2007).

This is the first report of alpha thalassemia prevalence in the general Brazilian population of European ancestry. The  $-\alpha^{3.7}$  frequency observed in this group was 0.02 (Table 1). This figure is close to that observed in Portuguese (3.5%) (Peres *et al.*, 1995) and Italians (5%) (Velati *et al.*, 1986) with whom southern European Brazilians share common ancestors, but it is significantly ( $p=0.001$ ) lower than in African Brazilians (Table 1). For this group, the genotypes of  $\alpha$ -thalassemia observed were 23.1%, with an allele frequency of 0.12. It is noteworthy that the  $-\alpha^{3.7}$  allele was similar in three out four Brazilian populations of African ancestry investigated despite different degrees of African admixture (Sonati *et al.*, 1991; Adorno *et al.*, 2005), and much higher than the prevalence describe in the North (7%) where Amerindian admixture is higher than African admixture (Souza *et al.*, 2009).

Among the patients with mild anemia and microcytosis that remained undiagnosed, it is possible that the non-deletional forms of  $\alpha$ -thalassemias determined by  $-\alpha^{\text{Hph}}$  and  $-\alpha^{\text{NcoI}}$  alleles, which are common in the Mediterranean populations (Foglietta *et al.*, 1996; Kattamis *et al.*, 1996; Di Bella *et al.*, 2006), might explain a proportion of cases mainly among those of European ancestry.

Blood indices were significantly different between alpha-thalassemia genotypes, beta-thalassemia trait and healthy individuals (Table 2). These data although with some overlap among them might provide reference values for new Brazilian patients with a suspicious of thalassemia.

In Brazil, previous studies have shown important regional differences related to the mutational profile of  $\beta$ -thalassemia carriers (Reichert *et al.*, 2008) but in relation to

$\alpha$ -thalassemias the picture is much more homogeneous therefore it will be easier to establish adequate public health policies and diagnostic services for this frequent genetic trait and microcytosis diagnosis.

We conclude that the occurrence of microcytosis not explained by iron deficiency or by an inflammatory state, the identification of  $\alpha$ -thalassemia is important to prevent erroneous and expensive investigations to define the etiology of anemia and unnecessary prolonged iron supplementation.

### **Acknowledgments**

The authors thank the financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Programa de Apoio de Núcleos de Excelência (PRONEX, Brazil), Institutos do Milênio (CNPq, Brazil), and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## References

- Abramson JH (2004) WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiol Perspect Innov* 1:6.
- Adorno EV, Couto FD, Moura Neto JP, Menezes JF, Rego M, Reis MG, Goncalves MS (2005) Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cad Saude Publica* 21:292-298.
- Bergeron J, Weng X, Robin L, Olney HJ, Soulieres D (2005) Prevalence of alpha-globin gene deletions among patients with unexplained microcytosis in a North-American population. *Hemoglobin* 29:51-60.
- Borges E, Wenning MR, Kimura EM, Gervasio SA, Costa FF, Sonati MF (2001) High prevalence of alpha-thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. *Braz J Med Biol Res* 34:759-762.
- Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossetti SG, Ferreira ME, Hutz MH (2003) Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *Am J Hum Biol* 15:824-834.
- Di Bella C, Salpietro C, La Rosa M, Cuppari C, Piraino B, Cutri MR, Rigoli L (2006) Identification of alpha-thalassemia mutations in subjects from Eastern Sicily (Italy) with abnormal hematological indices and normal Hb A2. *Ann Hematol* 85:829-831.
- Dode C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochette J (1993) Rapid analysis of -alpha 3.7 thalassaemia and alpha alpha alpha anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. *Br J Haematol* 83:105-111.
- Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB (1993) The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol* 6:215-262.
- Foglietta E, Deidda G, Graziani B, Modiano G, Bianco I (1996) Detection of alpha-globin gene disorders by a simple PCR methodology. *Haematologica* 81:387-396.
- Higgs DR, Weatherall DJ (2009) The alpha thalassaemias. *Cell Mol Life Sci* 66:1154-1162.
- Kattamis AC, Camaschella C, Sivera P, Surrey S, Fortina P (1996) Human alpha-thalassemia syndromes: detection of molecular defects. *Am J Hematol* 53:81-91.
- Kazazian HH, Jr. (1990) The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol* 27:209-228.



- Lafferty JD, Barth DS, Sheridan BL, McFarlane AG, Halchuk LM, Crowther MA (2007) Prevalence of thalassemia in patients with microcytosis referred for hemoglobinopathy investigation in Ontario: a prospective cohort study. *Am J Clin Pathol* 127:192-196.
- Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.
- Leite FP, Callegari-Jacques SM, Carvalho BA, Kommers T, Matte CH, Raimann PE, Schwengber SP, Sortica VA, Tsuneto LT, Petzl-Erler ML, Salzano FM, Hutz MH (2008) Y-STR analysis in Brazilian and South Amerindian populations. *Am J Hum Biol* 20:359-363.
- Leite FP, Santos SE, Rodriguez EM, Callegari-Jacques SM, Demarchi DA, Tsuneto LT, Petzl-Erler ML, Salzano FM, Hutz MH (2009) Linkage disequilibrium patterns and genetic structure of Amerindian and non-Amerindian Brazilian populations revealed by long-range X-STR markers. *Am J Phys Anthropol* 139:404-412.
- 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* 100:177-182.
- Peres MJ, Romao L, Carreiro H, Picanco I, Batalha L, Magalhaes HA, Martins MC, Lavinha J (1995) Molecular basis of alpha-thalassemia in Portugal. *Hemoglobin* 19:343-352.
- Reichert VC, de Castro SM, Wagner SC, de Albuquerque DM, Hutz MH, Leistner-Segal S (2008) Identification of beta thalassemia mutations in South Brazilians. *Ann Hematol* 87:381-384.
- Salzano FM, Bortolini MC (2002) The evolution and genetics of Latin American populations. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sivera P, Roetto A, Mazza U, Camaschella C (1997) Feasibility of molecular diagnosis of alpha-thalassemia in the evaluation of microcytosis. *Haematologica* 82:592-593.
- Sonati MF, Farah SB, Ramalho AS, Costa FF (1991) High prevalence of alpha-thalassemia in a black population of Brazil. *Hemoglobin* 15:309-311.
- Souza AE, Cardoso GL, Takanashi SY, Guerreiro JF (2009) Alpha-thalassemia (3.7 kb deletion) in a population from the Brazilian Amazon region: Santarem, Para State. *Genet Mol Res* 8:477-481.
- Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS (2001) A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood* 98:250-251.

- Velati C, Sampietro M, Biassoni M, Cappellini MD, Wainscoat JS, Higgs DR, Fiorelli G (1986) Alpha thalassaemia in an Italian population. *Br J Haematol* 63:497-501.
- Zago MA, Melo Santos EJ, Clegg JB, Guerreiro JF, Martinson JJ, Norwich J, Figueiredo MS (1995) Alpha-globin gene haplotypes in South American Indians. *Hum Biol* 67:535-546.
- Zembruski 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* 70:822-828.

**Table 1**  $-\alpha^{3.7}$  allele and genotype frequencies.

	<i>Allelic frequencies</i>		<i>Genotypes n (%)</i>		
	A $\alpha$	$-\alpha^{3.7}$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$
Healthy subjects			N (%)	N (%)	N (%)
Euro-descendants	0.98	0.02	192 (95.5)	9 (4.5)	0
African Brazilians	0.88	0.12	147 (77.0)	41 (21.5)	3 (1.6)
p	<0.001		<0.001		
Microcytic anemia	0.80	0.20	69 (68.3)	23 (22.8)	9 (8.9)
p <sup>§</sup>	<0.001		<0.001	<0.001	0.027
p <sup>¶</sup>	<0.001		0.01		<0.001

<sup>§</sup>comparison with Euro-descendants; <sup>¶</sup>comparison with African Brazilians.

**Table 2** Blood indices in alpha-thalassemia genotypes, beta-thalassemia trait and healthy individuals

Blood index	Subject groups (mean $\pm$ std. error)				P
	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	Beta-thal	Healthy	
Hb (g/dL)*	11.5 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	11.3 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	11.2 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	14.1 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	< 0.001
RBC (x 10 <sup>12</sup> /L)*	4.65 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	5.00 $\pm$ 0.17 <sup>a,b</sup>	5.47 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	4.66 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	< 0.001
Hct (%)*	35.8 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>	35.8 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	35.4 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	42.5 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	< 0.001
MCV (fl)	77.3 $\pm$ 1.35 <sup>a</sup>	71.6 $\pm$ 1.77 <sup>b</sup>	67.0 $\pm$ 1.44 <sup>c</sup>	91.3 $\pm$ 0.38 <sup>d</sup>	< 0.001
MCH (pg)	24.9 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	22.6 $\pm$ 0.73 <sup>b</sup>	21.4 $\pm$ 0.57 <sup>c</sup>	30.2 $\pm$ 0.14 <sup>d</sup>	< 0.001
MCHC (%)	31.9 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	31.6 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	31.9 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	33.1 $\pm$ 0.76 <sup>b</sup>	< 0.001

Hb: hemoglobin; RBC: Red blood cell; Hct: Hematocrit; MCV: Mean corpuscular volume; MCH: Mean corpuscular hemoglobin, and MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration.

Means indicated by same letters do not differ significantly ( $\alpha=0.05$ ) by the SNK test except for RBC, in which was applied the Tamhane test; \* tests applied on age and sex corrected values.

Capítulo V

**$\beta^S$  globin gene haplotypes and  $\alpha$  thalassemia in sickle cell patients  
from Rio Grande do Sul, Brazil**

---

Manuscrito em preparação a ser submetido à revista Human Biology

**$\beta^S$  globin gene haplotypes and  $\alpha$  thalassemia in sickle cell patients from Rio Grande do Sul, Brazil**

Sandrine C. Wagner<sup>1,2</sup>, Juliana Dal-Ri Lindenau<sup>1</sup>, Tatiana P. Gonzalez<sup>1</sup>, Ana Paula Santin<sup>3</sup>, Simone M. de Castro<sup>3</sup>, Sidia M. Callegari-Jacques<sup>1,4</sup>, Mara H. Hutz<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>2</sup>Instituto de Ciências da Saúde, Biomedicina, Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>3</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Estatística, Instituto de Matemática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

**Keywords:**  $\beta^S$  globin haplotypes, sickle cell disease, Hemoglobin S,  $\alpha$  thalassemia

Corresponding author:

Mara H. Hutz

Departamento de Genética  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Av Bento Gonçalves, 9500  
Caixa Postal 15053  
91501-970 - Porto Alegre, RS, Brazil  
Phone: 55-51-33086720  
FAX: 55 -51-33087311  
E-mail: [mara.hutz@ufrgs.br](mailto:mara.hutz@ufrgs.br)

## ABSTRACT

Sickle cell hemoglobin is the result of a single nucleotide mutation ( $G\underline{A}G \rightarrow G\underline{T}G$ ) at the sixth amino acid position of the beta ( $\beta$ ) globin chain. The  $\beta^S$  gene is in linkage disequilibrium with five main haplotypes defined by restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) in the  $\beta$ -globin-like gene cluster named according to their ethnic and geographic origins: Bantu (CAR), Benin (BEN), Senegal (SEN), Camaroon (CAM) and Saudi. The alpha ( $\alpha$ )-thalassemia, that result from the defective synthesis of the  $\alpha$  globin chains, presents a large distribution, including African and Mediterranean regions.  $\beta^S$  haplotypes and  $\alpha$  thalassemia were studied in 110 (220 chromosomes) sickle cell disease patients from Rio Grande do Sul, South Brazil.  $\beta^S$  haplotypes were determined by PCR-RFLP methods. The  $\alpha$ -globin genotypes were screened by PCR in multiplex reactions. Among the 220 chromosomes analyzed, the CAR haplotype was the most prevalent (67.3%), followed by BEN (25.0%), CAM (0.9%) and SEN (0.5%). Fourteen chromosomes (6.4%) were classified as atypical. For  $\alpha$  thalassemia, only  $-\alpha^{3.7}$  deletion was observed in an allele frequency of 0.14. The distribution of  $\beta^S$  haplotypes and  $\alpha$  thalassemia, represented by the  $-\alpha^{3.7}$  deletion, are similar to those observed in other Brazilian populations, especially regarding the frequency of CAR haplotype. The results in this study help to clarify the origin of South Brazilian population and also corroborate the known historical data on this matter.

Sickle cell hemoglobin is the result of a single nucleotide mutation ( $\text{GAG} \rightarrow \text{GTG}$ ) at the sixth amino acid position of the beta ( $\beta$ ) globin chain. Sickle cell disease is caused by homozygosity  $\beta^S$  gene and has a worldwide distribution. The disease is a severe chronic hemolytic anemia, progressing in a heterogeneous clinical course. Many factors are associated with this clinical variability, as coinheritance with Hb C,  $\alpha$  and  $\beta$  thalassemias, as well as high fetal hemoglobin levels (Higgs, Aldridge et al. 1982; Frenette and Atweh 2007).

The  $\beta^S$  gene is in linkage disequilibrium with five main haplotypes defined by restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) in the  $\beta$ -globin-like gene cluster. These haplotypes are named according to their ethnic and geographic origins: Bantu (CAR), originated in South-Central and Eastern Africa; Benin (BEN), in Midwestern Africa; Senegal (SEN), in Atlantic West Africa; Camaroon (CAM), along the west coast of Africa, and Saudi, from the Indian subcontinent and the eastern Arabian peninsula (Pagnier, Mears et al. 1984; Kulozik, Wainscoat et al. 1986; Lapoumeroulie, Dunda et al. 1992).

The  $\alpha$ -thalassemias, a result from the defective synthesis of the  $\alpha$  globin chains, show a large distribution, extending from sub-Saharan Africa through the Mediterranean region and Middle East, to the Indian sub-continent and East and South East Asia (Higgs and Weatherall 2009). The most common  $\alpha^+$  thalassemia deletion alleles are  $-\alpha^{3.7}$  and  $-\alpha^{4.2}$ . The  $-\alpha^{3.7}$  allele has been observed all over the world, with higher frequencies in some African and Mediterranean populations. The  $-\alpha^{4.2}$  is most common in Asian countries although it also occurs in Mediterranean populations (Flint, Harding et al. 1998).

$\beta^S$  haplotypes and  $\alpha$  thalassemia in sickle cell disease have been studied in different regions of Brazil (Zago, Figueiredo et al. 1992; Figueiredo, Silva et al. 1994; Goncalves, Nechtman et al. 1994; Pante-de-Souza, Mousinho-Ribeiro et al. 1998; Zago, Silva et al. 2000; Goncalves, Bomfim et al. 2003; Cardoso and Guerreiro 2006; Bezerra, Santos et al. 2007), as tools to clarify population origins, once this mutation is absent among Native Americans and was introduced into the American continent basically by gene flow from Africa during the slave trade from the 16th to the 19th century (Zago, Melo Santos et al. 1995; Salzano and Bortolini 2002). In this study, we determined the  $\beta^S$  haplotypes and  $\alpha$  thalassemia frequencies in sickle cell disease (SCD) patients from Rio Grande do Sul, South Brazil.



## MATERIALS AND METHODS

This study comprises 110 nonconsanguineous SCD patients, screened using isoelectric focusing (IEF) and/or cation exchange high performance liquid chromatography (HPLC) and confirmed by a PCR-RFLP approach with DdE enzyme. All patients were directed by the Neonatal Screening Reference Service or health care centers. The Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul approved the study protocol.

Genomic DNA was isolated from the peripheral blood samples through a salting out procedure (Lahiri and Nurnberger 1991). Haplotype analysis was performed by PCR-RFLP for the following polymorphic sites in the  $\beta$  globin gene cluster: *HindIII*-G $\gamma$ , *HindIII*-A $\gamma$ , *HincII*- $\psi\beta$ , *HincII*, 3' $\psi\beta$ , *HinfI*-5' $\beta$  as previously described (Sutton, Bouhassira et al. 1989). Haplotypes were derived using the Multiple Locus Haplotype Analysis program (Long 1999). The  $\alpha$ -globin genotypes were screened by PCR in multiplex reactions as described by Tan et al. (Tan, Quah et al. 2001) or in single reactions with primers and protocols described by Dode et al. (Dode, Krishnamoorthy et al. 1993). All genotypes were determined after electrophoresis of the amplicons in agarose gels containing ethidium bromide, using a 100 bp ladder to score the band sizes. A known heterozygous sample was also used as a positive control in all gels.

Confidence intervals for the calculated frequencies were obtained using WINPEPI 9.7 (Abramson 2004). A dendrogram was built (Figure 2) in POPTREE program (Takezaki 2001), using  $D_A$  distance (Nei, Tajima et al. 1983) and UPGMA clustering algorithm, in order to better visualize the clustering patterns for the different American populations. Haplotypes showing atypical RFLP patterns were excluded for dendrogram construction. Weighted means were calculated for haplotypic frequencies from Venezuela data and different Brazilian populations.

## RESULTS

The  $\beta^S$  haplotypes identified in 110 patients (220 chromosomes) are shown in Table 1. CAR haplotype was the most frequent (67.3%; IC 95%: 60.9 – 73.2), followed by BEN haplotype (25.0%; IC 95%: 19.6- 31.0), CAM (0.9%; IC 95%: 0.2 – 3.0) and SEN (0.5%; IC 95%: 0.0- 2.2). The Saudi haplotype was not found in this sample.

Fourteen chromosomes (6.4%) were classified as atypical. With regard to the  $\beta^S$  genotypes, 47.3% of patients showed the CAR/CAR genotype, 30.0% CAR/BEN, 9.1% CAR/Atypical, 8.2% BEN/BEN, 3.6% BEN/Atypical, 0.9% CAR/CAM and 0.9% SEN/CAM.

The dendrogram (Figure 1) shows a population separation in different groups, each of them representative of the haplotypic distribution pattern in these populations. As expected, populations with high frequencies of the CAR haplotype were clustered, as were those showing high frequencies for the BEN haplotype, as observed in Tables 1 and 2.

For  $\alpha$  thalassemia investigation, all patients were screened for  $-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ,  $-\alpha^{20.5}$ ,  $-\alpha^{SEA}$  and  $-\alpha^{MED}$  deletions but only the  $-\alpha^{3.7}$  allele was observed. The allele frequency observed for  $-\alpha^{3.7}$  in this sample was 0.14.

## DISCUSSION

According to results from other Brazilian regions (Table 1), CAR haplotype was the most frequent, followed by BEN haplotype. These results are in accordance with historical reports on slave traffic to Brazil. It is estimated that during the period between 1701 and 1816, 68% of imported slaves came from Angola and the remainder from the Benin region. From 1871 to 1843, 90% of slaves came from Congo, Angola and Mozambique (Curtain 1969). As in other studies, SEN haplotype was found in a low frequency (0.5%). The higher frequency for this haplotype is found in Belem, North Brazil. This is in accordance on what was expected based on historical data for the slave trade of Atlantic West African populations to Northern Brazil (10%) (Cardoso and Guerreiro 2006), considering the high frequency of this haplotype (>80%) in Senegal and Cape Verde (Pagnier, Mears et al. 1984; Lavinha, Goncalves et al. 1992). The CAM haplotype is observed here (0.9%) and in other Brazilian regions, always in lower frequencies (0.9-1.3%) probably due to domestic slave trade and later internal migrations from regions supplied with slaves from Central West Africa, where this haplotype has been found (Oner, Dimovski et al. 1992).

Table 2 shows the frequency of  $\beta^S$  haplotypes in different American populations. We can observe that the results from this study are different from those observed among

other American countries, confirming the diversity of the African influence in Rio Grande do Sul and other Brazilian regions. In American countries BEN haplotype is the most prevalent, excepted for Colombia e Mexico, where CAR haplotype is the most prevalent (Oner, Dimovski et al. 1992; Cuellar-Ambrosi, Mondragon et al. 2000; Magana, Ongay et al. 2002). This distribution may be explained by historical reports of colonial power in these countries: Spain, France and Great Britain (Curtain 1969). Both British and French bought slaves from the Midwestern African regions where the BEN haplotype is prevalent while slaves imported by the Spanish were mainly from Atlantic Central Africa, where CAR haplotype is prevalent.

As observed in Figure 1, American populations are clustered differently mainly due to the different slave traffic flow reported for the region. Populations presenting higher frequencies of CAR than BEN haplotype are clustered together (Colombia, Brazil and Mexico) whereas populations with higher BEN frequencies formed another cluster (EUA, Canada, Trinidad, Guadalupe and Jamaica). Other populations present similar BEN and CAR haplotype frequencies. This similarity explains the cluster formed by Venezuela, Suriname and Cuba. This cluster pattern appears to reflect geographical data, since a North, Central and South America separation can be observed.

Fourteen chromosomes were identified as atypical (chromosomes with less common haplotypes). Some of them were studied previously and diverse genetic mechanisms involved in generation of atypical haplotypes in  $\beta^S$  gene were demonstrated, such as recombination or punctual substitutions or nonreciprocal sequence transfer (conversion) in the pre-existing common haplotypes instead of recurrent *de novo*  $\beta^S$  mutations (Zago, Silva et al. 2000). Subsequently, it was demonstrated that these events can be observed in typical  $\beta^S$  haplotypes in a similar way to those that generate atypical haplotypes (Zago, Silva et al. 2001).

For  $\alpha$  thalassemia, only  $-\alpha^{3.7}$  allele was observed, presenting an allele frequency of 0.14. These results are not statistically different from that observed in 191 African Brazilians for the same region (0.14 vs. 0.12,  $p > 0.05$ ) (Wagner, Castro et al. 2010) and are in accordance to African origin, corroborating the suggestion that this mutation had been introduced by African individuals.

In summary, the distributions of  $\beta^S$  haplotypes and  $\alpha$  thalassemia, represented by  $-\alpha^{3.7}$  deletion, are similar from those observed in other Brazilian populations, especially

regarding the frequency of CAR haplotype. The results in this study help to clarify the origin of South Brazilian population and also corroborate the known historical data on this matter.

**Acknowledgments:** The authors thank the financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Programa de Apoio de Núcleos de Excelência (PRONEX, Brazil), Institutos do Milênio (CNPq, Brazil), and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Table 1: Frequency (%) of  $\beta^S$  haplotypes in Rio Grande do Sul and other Brazilian populations

Population	N	Haplotypes					Reference
		CAR	BEN	SEN	CAM	Atypical	
Belém (PA)	60	66.7	30.0	3.3	-	-	(Pante-de-Souza, Mousinho-Ribeiro et al. 1998)
Belém (PA)	260	66.0	21.8	10.9	1.3	-	(Cardoso and Guerreiro 2006)
Pernambuco (PE)	127	81.1	14.2	-	0.8	3.9	(Bezerra, Santos et al. 2007)
Salvador (BA)	160	48.1	45.6	0.6	-	5.6	(Goncalves, Bomfim et al. 2003)
Salvador (BA)	42	54.8	45.2	-	-	-	(Figueiredo, Silva et al. 1994)
Campinas (SP)	142	64.8	35.2	-	-	-	(Goncalves, Nechtman et al. 1994)
Ribeirão Preto (SP)	67	73.0	25.7	1.3	-	-	(Zago, Figueiredo et al. 1992)
Vale do Ribeira (SP)*	86	81.4	8.1	8.1	2.3	-	(De Mello Auricchio, Vicente et al. 2007)
Rio Grande do Sul (RS)	220	67.3	25.0	0.5	0.9	6.4	Present study

N: number of chromosomes; \*African-Derived population

Table 2: Frequency (%) of  $\beta^S$  haplotypes in different American populations

	N	Haplotypes						Reference
		CAR	BEN	SEN	CAM	SAUDI	Atypical	
Canada	61	11.5	49.2	13.1	13.1	-	13.1	(Oner, Dimovski et al. 1992)
U.S.	371	19.1	55.3	15.1	3.5	-	7.0	(Oner, Dimovski et al. 1992)
Surinam	77	29.9	53.2	2.6	2.6	-	11.7	(Oner, Dimovski et al. 1992)
Cuba	198	40.9	51.0	8.1	-	-	-	(Muniz, Corral et al. 1995)
Guadeloupe	832	11.0	74.7	6.1	2.3	0.7	5.0	(Keclard, Romana et al. 1997)
Jamaica <sup>4,5</sup>	244	9.8	75.4	2.9	2.0	0.8	9.0	(Wainscoat, Bell et al. 1983; Antonarakis, Boehm et al. 1984)
Trinidad	283	17.3	61.8	8.5	3.5	3.2	5.6	(Jones-Lecointe, Smith et al. 2008)
Colombia	92	55.5	34.8	4.3	5.4	-	-	(Cuellar-Ambrosi, Mondragon et al. 2000)
Mexico	37	78.8	18.2	-	-	-	3.0	(Magana, Ongay et al. 2002)
Venezuela	176	32.4	51.1	14.2	2.3	-	-	(Arends, Alvarez et al. 2000)
Venezuela	90	43.4	51.1	3.3	-	-	2.2	(Moreno, Martínez et al. 2002)
Venezuela	359	36.4	51.5	10.6	1.5	-	-	*
Brazil	1176	65.0	31.5	3.0	0.5	-	-	**

N: number of chromosomes; \*weighted mean for Venezuela data; \*\*weighted mean for Brazilian population. Both weighted means were calculated excluding atypical haplotypes.

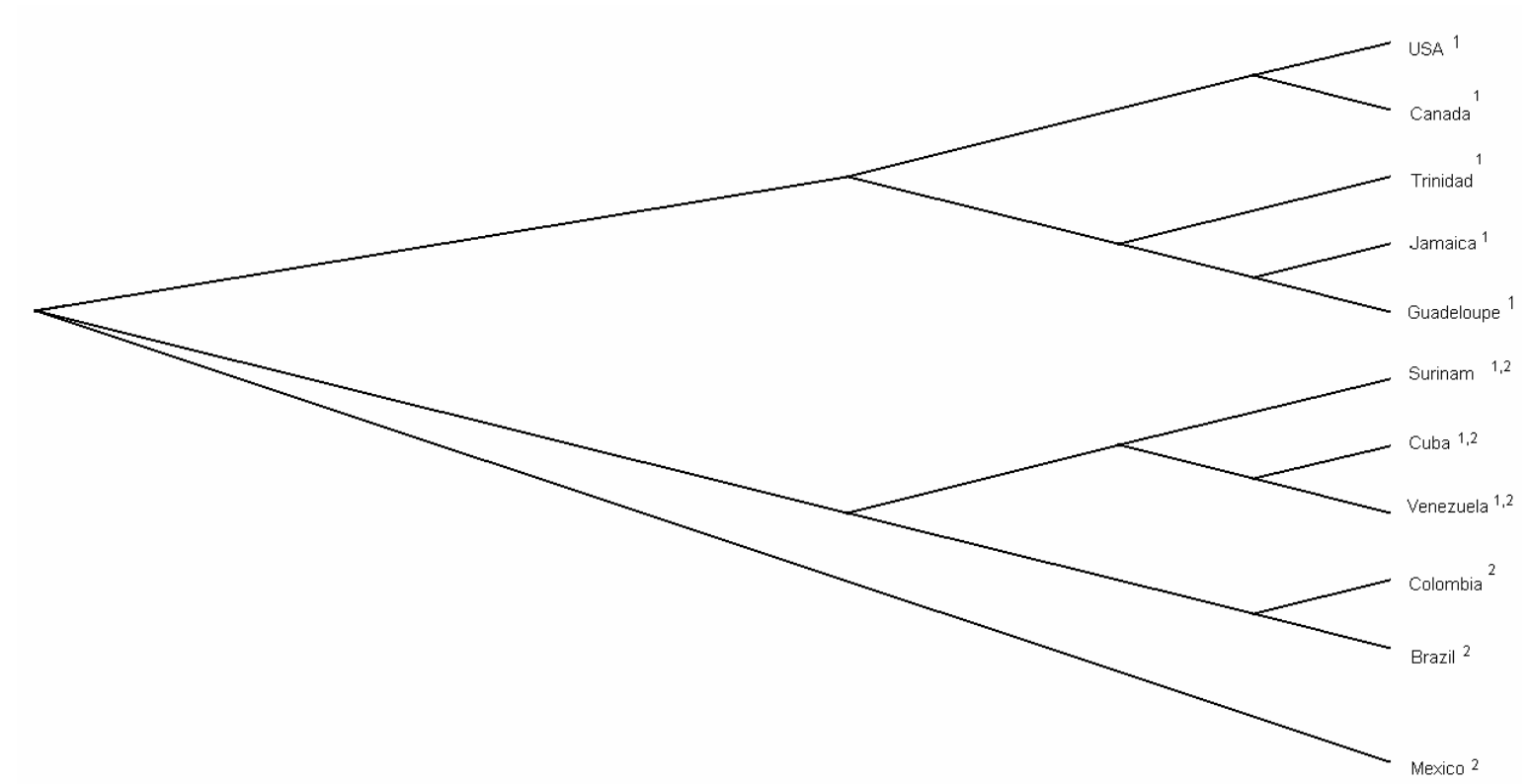


Figure 1: Dendrogram showing clustering patterns for different American populations according to  $\beta^S$  haplotypes. 1 represents higher BEN haplotype prevalence; 2 represents higher CAR haplotype prevalence. Countries indicated by 1 and 2 present similar haplotype frequencies for CAR and BEN

**LITERATURE CITED**

- Abramson, J. H. (2004). "WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists." Epidemiol Perspect Innov **1**(1): 6.
- Antonarakis, S. E., C. D. Boehm, et al. (1984). "Origin of the beta S-globin gene in blacks: the contribution of recurrent mutation or gene conversion or both." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(3): 853-6.
- Arends, A., M. Alvarez, et al. (2000). "Determination of beta-globin gene cluster haplotypes and prevalence of alpha-thalassemia in sickle cell anemia patients in Venezuela." Am J Hematol **64**(2): 87-90.
- Bezerra, M. A., M. N. Santos, et al. (2007). "Molecular variations linked to the grouping of beta- and alpha-globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the State of Pernambuco, Brazil." Hemoglobin **31**(1): 83-8.
- Cardoso, G. L. and J. F. Guerreiro (2006). "African gene flow to North Brazil as revealed by HBB\*S gene haplotype analysis." Am J Hum Biol **18**: 93-98.
- Cuellar-Ambrosi, F., M. C. Mondragon, et al. (2000). "Sickle cell anemia and beta-globin gene cluster haplotypes in Colombia." Hemoglobin **24**(3): 221-5.
- Curtain, P. D. (1969). The Atlantic Slave Trade: a census. Milwaukee, University of Wisconsin Press.
- De Mello Auricchio, M. T., J. P. Vicente, et al. (2007). "Frequency and origins of hemoglobin S mutation in African-derived Brazilian populations." Hum Biol **79**(6): 667-77.
- Dode, C., R. Krishnamoorthy, et al. (1993). "Rapid analysis of -alpha 3.7 thalassaemia and alpha alpha alpha anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis." Br J Haematol **83**(1): 105-11.
- Figueiredo, M. S., M. C. Silva, et al. (1994). "The heterogeneity of the beta s cluster haplotypes in Brazil." Gene Geogr **8**(1): 7-12.
- Flint, J., R. M. Harding, et al. (1998). "The population genetics of the haemoglobinopathies." Baillieres Clin Haematol **11**(1): 1-51.
- Frenette, P. S. and G. F. Atweh (2007). "Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise." J Clin Invest **117**(4): 850-8.
- Goncalves, M. S., G. C. Bomfim, et al. (2003). "BetaS-haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil." Braz J Med Biol Res **36**(10): 1283-8.
- Goncalves, M. S., J. F. Nechtman, et al. (1994). "Sickle cell disease in a Brazilian population from Sao Paulo: a study of the beta s haplotypes." Hum Hered **44**(6): 322-7.
- Higgs, D. R., B. E. Aldridge, et al. (1982). "The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease." N Engl J Med **306**(24): 1441-6.
- Higgs, D. R. and D. J. Weatherall (2009). "The alpha thalassaemias." Cell Mol Life Sci **66**(7): 1154-62.
- Jones-Lecointe, A., E. Smith, et al. (2008). "Beta-globin gene cluster haplotypes and alpha-thalassemia in sickle cell disease patients from Trinidad." Am J Hum Biol **20**(3): 342-4.
- Keclard, L., M. Romana, et al. (1997). "Sickle cell disorder, beta-globin gene cluster haplotypes and alpha-thalassemia in neonates and adults from Guadeloupe." Am J Hematol **55**(1): 24-7.
- Kulozik, A. E., J. S. Wainscoat, et al. (1986). "Geographical survey of beta S-globin gene haplotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation." Am J Hum Genet **39**(2): 239-44.



- Lahiri, D. K. and J. I. Nurnberger, Jr. (1991). "A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies." Nucleic Acids Res **19**(19): 5444.
- Lapoumeroulie, C., O. Dunda, et al. (1992). "A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type." Hum Genet **89**(3): 333-7.
- Lavinha, J., J. Goncalves, et al. (1992). "Importation route of the sickle cell trait into Portugal: contribution of molecular epidemiology." Hum Biol **64**(6): 891-901.
- Long, J. C. (1999). Multiple Locus Haplotype Analysis. Software and documentation distributed by the author. Bethesda, Laboratory of Neurogenetics, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, National Institutes of Health.
- Magana, M. T., Z. Ongay, et al. (2002). "Analysis of betaS and betaA genes in a Mexican population with African roots." Blood Cells Mol Dis **28**(2): 121-6.
- Moreno, N., J. A. Martínez, et al. (2002). "Beta-globin gene cluster haplotypes in Venezuela sickle cell patients from the state of Aragua." Genet Mol Biol **25**: 21-24.
- Muniz, A., L. Corral, et al. (1995). "Sickle cell anemia and beta-gene cluster haplotypes in Cuba." Am J Hematol **49**(2): 163-4.
- Nei, M., F. Tajima, et al. (1983). "Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data." J Mol Evol **19**(2): 153-70.
- Oner, C., A. J. Dimovski, et al. (1992). "Beta S haplotypes in various world populations." Hum Genet **89**(1): 99-104.
- Pagnier, J., J. G. Mears, et al. (1984). "Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(6): 1771-3.
- Pante-de-Souza, G., R. C. Mousinho-Ribeiro, et al. (1998). "Origin of the hemoglobin S gene in a northern Brazilian population: the combined effects of slave trade and internal migrations." Genetic and Molecular Biology **21**(4): 365-373.
- Salzano, F. M. and M. C. Bortolini (2002). The evolution and genetics of Latin American populations. Cambridge, Cambridge University Press.
- Sutton, M., E. E. Bouhassira, et al. (1989). "Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes." Am J Hematol **32**(1): 66-9.
- Takezaki, N. (2001). "<http://homes.bio.psu.edu/people/Faculty/Nei/Lab/programs.html>".
- Tan, A. S., T. C. Quah, et al. (2001). "A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia." Blood **98**(1): 250-1.
- Wagner, S. C., S. M. Castro, et al. (2010). "Prevalence of alpha-thalassemia in south Brazil: importance to microcytic anemia diagnosis." Genet Mol Biol **Submitted**.
- Wainscoat, J. S., J. I. Bell, et al. (1983). "Multiple origins of the sickle mutation: evidence from beta S globin gene cluster polymorphisms." Mol Biol Med **1**(2): 191-7.
- Zago, M. A., M. S. Figueiredo, et al. (1992). "Bantu beta s cluster haplotype predominates among Brazilian blacks." Am J Phys Anthropol **88**(3): 295-8.
- Zago, M. A., E. J. Melo Santos, et al. (1995). "Alpha-globin gene haplotypes in South American Indians." Hum Biol **67**(4): 535-46.
- Zago, M. A., W. A. Silva, Jr., et al. (2000). "Atypical beta(s) haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms." Am J Hematol **63**(2): 79-84.
- Zago, M. A., W. A. Silva, Jr., et al. (2001). "Rearrangements of the beta-globin gene cluster in apparently typical betaS haplotypes." Haematologica **86**(2): 142-5



Os pontos mais específicos referentes aos resultados obtidos durante o trabalho foram discutidos nas seções correspondentes (II a V) da presente Tese. Neste capítulo serão retomados alguns deles e discutidos também aspectos mais gerais, que se aplicam a todos os resultados observados, buscando situá-los dentro do contexto dos aspectos epidemiológicos, laboratoriais, clínicos e de aplicabilidade dos conhecimentos obtidos. Após, serão discutidas as perspectivas para a continuidade dessa linha de pesquisa.

Para contemplar o objetivo principal desta tese, foram avaliadas as prevalências das hemoglobinopatias no Rio Grande do Sul. Inicialmente, foram estudadas amostras de sangue de recém-nascidos no Estado, incluídos no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN). Os resultados aqui apresentados mostraram uma ampla, porém heterogênea, distribuição das Hb S e Hb C no Estado. Ainda, quando comparados os resultados dessas hemoglobinas na região Sul do país, incluindo os dados do Estado do Paraná, com aqueles obtidos nos demais Estados, como Rio de Janeiro, Bahia e Minas Gerais, percebe-se uma grande diferença entre elas em termos de prevalência.

Essas informações podem ser abordadas com três aspectos distintos. O primeiro reflete a heterogeneidade da população brasileira e do Rio Grande do Sul, em consequência dos diferentes fluxos migratórios no passado, corroborando estudos antropológicos realizados em diferentes regiões do país (Callegari-Jacques, Grattapaglia et al., 2003; Leite, Callegari-Jacques et al., 2008). O segundo refere-se essencialmente ao aspecto básico da triagem neonatal para hemoglobinopatias, que tem por objetivo identificar todas as crianças com doenças falciformes ainda no período neonatal, e na sequência incluí-las em programas de atendimento especial, objetivando a diminuição da morbi-mortalidade (Old, 2007). No país, essas crianças são incluídas no Programa Nacional de Atenção às Pessoas com Doenças Falciformes e outras Hemoglobinopatias, contempladas pela Portaria 1018/05, do Ministério da Saúde. Além disso, a identificação de um recém-nascido com hemoglobinopatia desencadeia uma cascata de testes nos demais membros da família, o que constitui num benefício adicional da triagem neonatal, que é a investigação e o aconselhamento genético em outros familiares. Também os dados aqui apresentados auxiliam na decisão e implantação de políticas de saúde pública, a fim de disponibilizar recursos físicos e humanos para o diagnóstico e acompanhamento dos indivíduos afetados.

Destaca-se que a amostra aqui estudada, oriunda da triagem neonatal, se constitui em excelente material para estudos populacionais, o que contribuiu para a identificação de outras hemoglobinas variantes, além das tipicamente contempladas pelas tecnologias utilizadas, e que são de muito baixa prevalência. A maioria dessas hemoglobinas não tem significado clínico, mas algumas, tais como hemoglobinas instáveis ou com alteração de afinidade ao oxigênio, ou associadas com o traço talassêmico  $\beta$ , podem apresentar manifestações clínicas (Old, 2007).

O terceiro, e não menos importante aspecto a ser contemplado, refere-se às metodologias tradicionalmente utilizadas na triagem neonatal para hemoglobinopatias. Elas têm por base sistemas eletroforéticos (FIE) ou cromatográficos (HPLC). A FIE apresenta melhor resolução das frações hemoglobínicas quando comparada a outros sistemas eletroforéticos, separando estas frações de acordo com o ponto isoelétrico (p.I). Já a HPLC apresenta exatidão, rapidez e quantificação das frações hemoglobínicas, através dos tempos de retenção (RT: *retention time*). É importante ressaltar que a maioria dos programas de triagem neonatal no Brasil faz uso de apenas uma tecnologia. Isso traz uma consequência intrínseca: algumas hemoglobinas apresentam RTs e/ou p.Is muito semelhantes aos das Hb F, Hb A, Hb A<sub>2</sub>, Hb D, Hb S ou Hb C, para as quais os sistemas são originalmente desenhados. Como resultado, muitas hemoglobinas variantes deixam de ser identificadas ou são erroneamente classificadas, como a dupla heterozigose para a Hb S/Shelby, inicialmente reconhecida como homozigose para Hb S (Wagner, Pereira et al., 2006) (Anexo II) e os 11 casos de heterozigose para Hb E-Saskatoon, inicialmente diagnosticados como Hb C ou Hb S, descritos nesta Tese.

Além dessas hemoglobinas, identificamos outras variantes, tanto de cadeia  $\alpha$  como variantes de cadeia  $\beta$ . Isso só foi possível devido à aplicação de técnicas de biologia molecular. Acreditamos que os poucos relatos de hemoglobinas variantes (detalhes na Tabela 1 do capítulo II) descritas ao longo dos estudos de triagem neonatal no país sejam devidos à falta de confirmação por outra tecnologia e ausência de estudos moleculares.

Ainda sobre as hemoglobinas variantes, Kleinert et al. (2008) realizaram estimativas sobre o número de variantes possíveis, levando em conta as mutações de ponto nos éxons dos genes das globinas  $\alpha$  e  $\beta$ , com consequente substituição de um aminoácido. De acordo com seus resultados, seriam possíveis 1.695 hemoglobinas variantes. Dessas, cerca de 60% já foram identificadas, restando ainda um grande

número de não identificadas. Os autores sugerem a incorporação da espectrometria de massa (capaz de diferenciar hemoglobinas com diferenças acima de 6 Da) na investigação dessas hemoglobinas, uma vez que algumas das substituições de aminoácidos são silenciosas e não detectadas pelas técnicas eletroforéticas e cromatográficas acima apresentadas. É importante ressaltar, como discutido anteriormente, que em muitas situações apenas a análise direta do DNA permite a correta identificação dessas variantes.

Neste estudo também foi avaliada a prevalência de talassemia  $\alpha$  em diversos grupos. Uma vez que essa prevalência era desconhecida na população do Rio Grande do Sul, houve a necessidade de determinar a mesma em grupos de controles euro e afrodescendentes. Os resultados foram então comparados com os de indivíduos com anemia microcítica a esclarecer (excluídas a deficiência de ferro e o traço talassêmico  $\beta$ ). Apenas a deleção  $-\alpha^{3,7}$  foi identificada, com 22,8% dos pacientes em heterozigose e 8,9% em homozigose. Esses valores são mais altos quando comparados com os obtidos em indivíduos controle, independente do grupo étnico de origem. No contexto de saúde pública, esses dados revelam sua importância, uma vez que as anemias microcíticas são alterações hematológicas observadas com grande frequência na parte clínica, acarretando consultas médicas, exames laboratoriais e suplementação com compostos ferrosos. Nossos dados mostram que a talassemia  $\alpha$  alcança uma grande frequência em nossa população e que sua investigação deve ser valorizada em âmbito laboratorial e clínico. Logo, indivíduos com número de eritrócitos, volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média diminuídos, exclusão de traço talassêmico  $\beta$  e deficiência de ferro devem ser investigados para a deleção  $-\alpha^{3,7}$ .

A análise dos dados obtidos com o desenvolvimento desta Tese permitiu a elaboração de um fluxograma (Figura 3) de trabalho para a identificação das hemoglobinas variantes e talassemias mais frequentes em nossa população. Esse fluxograma, a partir dos dados hematológicos, contempla a associação dos resultados de HPLC, FIE e sequenciamento dos genes  $\alpha$  e  $\beta$  na investigação das hemoglobinopatias.

Por fim, os resultados obtidos durante a execução deste estudo mostraram o perfil das hemoglobinopatias e talassemias no Estado, refletindo o impacto da imigração de indivíduos da África e da Europa (também estudados a partir dos dados dos haplótipos e de miscigenação). A diversidade de mutações observadas torna necessária a

Wagner

implantação de laboratórios de diagnóstico molecular, recursos humanos especializados e uma estratégia de trabalho que permita, de forma rápida e econômica, identificar uma grande variedade dessas alterações.

## Fluxograma

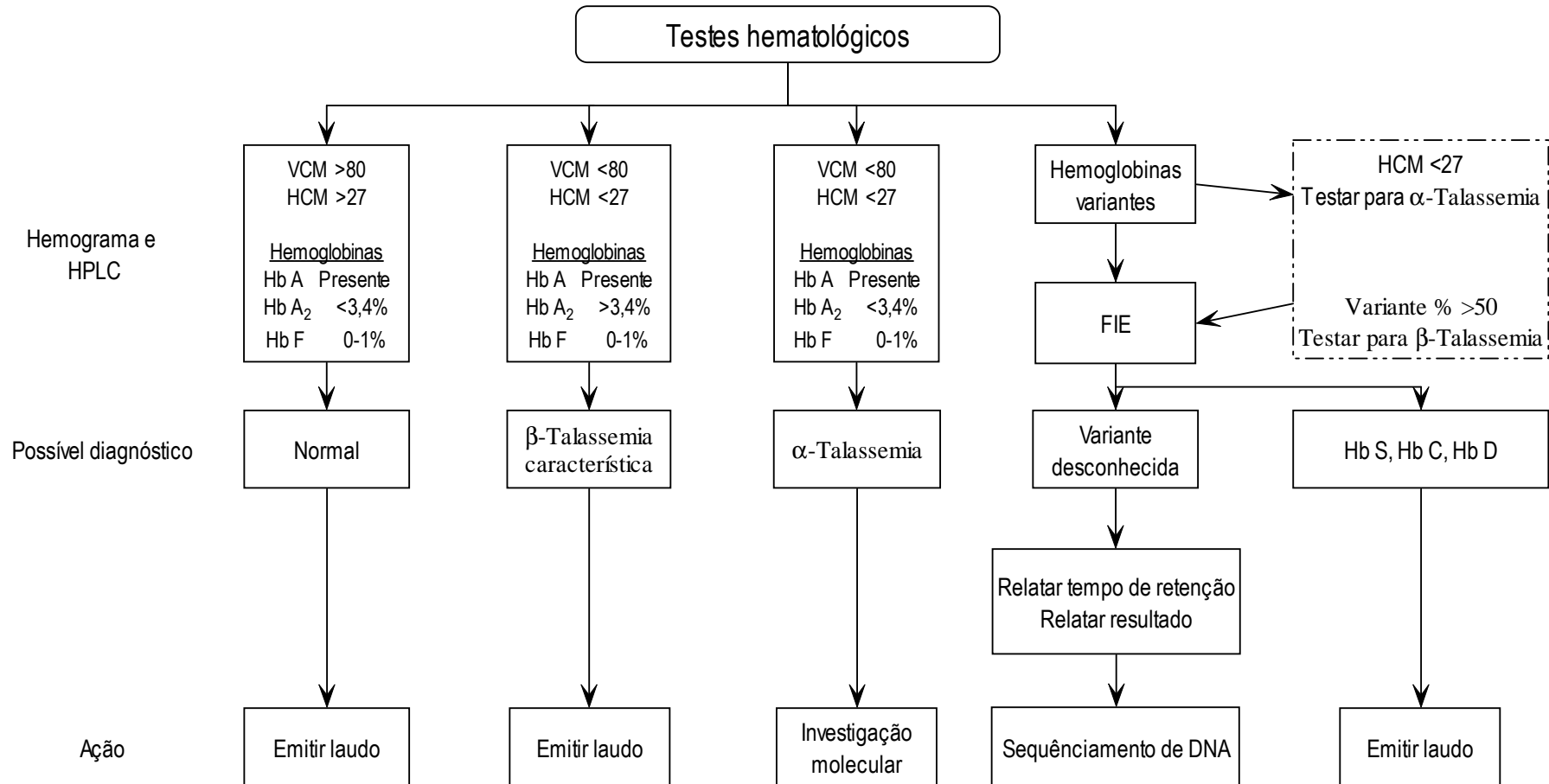


Figura 3: Fluxograma para a identificação das hemoglobinas variantes e talassemias





Na presente Tese, foi realizado o maior estudo sobre as hemoglobinopatias e talassemias no Rio Grande do Sul até o momento. É evidente que este trabalho não tem a pretensão de esgotar o assunto, mas sim a intenção de dar continuidade a essa linha de pesquisa.

Um dos primeiros pontos a serem avaliados é a relação genótipo-fenótipo em pacientes homocigotos para Hb S. Diversos estudos têm almejado correlacionar ou determinar a influência dos haplótipos de cadeia  $\beta$  com os diversos aspectos clínicos apresentados por esses pacientes, inclusive relacionando a taxa de sobrevivência. Dessa forma, sugerimos a condução de um estudo retrospectivo com seguimento contemporâneo (estudo longitudinal) a partir dos registros da triagem neonatal, a fim de estabelecer a prevalência desses haplótipos nos recém-nascidos triados e em indivíduos adultos. Além dos estudos dos haplótipos, a influência de outros genes envolvidos na patogênese da anemia falciforme, como os polimorfismos nos genes da UGT1A1, também pode ser avaliada durante este estudo.

Desde o início deste trabalho, diversos indivíduos (e seus familiares) foram diagnosticados como portadores de hemoglobinas variantes. O encaminhamento e posterior seguimento desses indivíduos em serviços de medicina geral e hematologia permitem o acompanhamento de variantes patológicas, bem como o estabelecimento das manifestações clínicas apresentadas. Além disso, o estudo dessas variantes pode servir de modelo para a compreensão dos aspectos estruturais e funcionais das hemoglobinas e de outras proteínas (Kimura, Oliveira et al., 2008).

A investigação das talassemias  $\alpha$  serviu como ferramenta para elucidação de casos de pacientes com anemia microcítica a esclarecer (descartada a deficiência de ferro e a talassemia  $\beta$ ). As técnicas aqui utilizadas permitiram a investigação das principais deleções implicadas nesta talassemia. Cerca de 31% dos indivíduos analisados foram diagnosticados como portadores da deleção  $-\alpha^{3,7}$  em homo ou heterocigose. Acreditamos que esse valor seja um pouco maior, uma vez que as variantes não delecionais, tais como o  $\alpha^{\text{HphI}}$ ,  $\alpha^{\text{NcoI}}$ ,  $\alpha\alpha^{\text{NcoI}}$  e  $\alpha^{\text{TSAUDI}}$ , além de grandes deleções (investigadas por *multiplex ligation-dependent probe amplification* - MLPA), não foram avaliadas. Destaca-se que cinco novas grandes deleções foram descritas no

país recentemente pelo grupo de pesquisadores da Unicamp ((Suemasu, Kimura et al., 2009).

Muitos avanços têm sido alcançados com os resultados dos estudos em hemoglobinopatias. A utilização da informação genética para aplicação médica é imediata, a partir do momento que diagnósticos são estabelecidos. Porém, mais estudos acerca das hemoglobinas variantes e talassemias, por meio de um maior conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese, fornecerão sinais para intervenções terapêuticas em cursos clínicos graves, tais como a anemia falciforme e a talassemia maior. Além disso, o conhecimento de variantes genéticas poderá identificar pacientes em maior ou menor risco de complicações clínicas, direcionando uma intervenção terapêutica mais adequada.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- Adorno, E. V., F. D. Couto, et al. (2005). "Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil." Cad Saude Publica **21**(1): 292-8.
- Allison, A. C. (1954). "Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection." Br Med J **1**(4857): 290-4.
- Allison, A. C. (2009). "Genetic control of resistance to human malaria." Curr Opin Immunol **21**(5): 499-505.
- Almeida, A. M., J. S. Henthorn, et al. (2001). "Neonatal screening for haemoglobinopathies: the results of a 10-year programme in an English Health Region." Br J Haematol **112**(1): 32-5.
- Araujo, A. S., W. A. Silva, et al. (2003). "A different molecular pattern of beta-thalassemia mutations in northeast Brazil." Hemoglobin **27**(4): 211-7.
- Bain, B. J. (2009). "Neonatal/newborn haemoglobinopathy screening in Europe and Africa." J Clin Pathol **62**(1): 53-6.
- Bardakdjian-Michau, J., M. Guilloud-Bataillie, et al. (2002). "Decreased morbidity in homozygous sickle cell disease detected at birth." Hemoglobin **26**(3): 211-7.
- Baysal, E., W. B. Qin, et al. (1994). "Alpha-Thalassemia and fetal hemoglobin." Blood **84**(9): 3241-2.
- Baysal, E., S. Sharma, et al. (1994). "Distribution of beta-thalassemia mutations in three Asian Indian populations with distant geographical locations." Hemoglobin **18**(3): 201-9.
- Bernini, L. F. and C. L. Harteveld (1998). "Alpha-thalassaemia." Baillieres Clin Haematol **11**(1): 53-90.
- Bevilaqua, L. R., V. S. Mattevi, et al. (1995). "Beta-globin gene cluster haplotype distribution in five Brazilian Indian tribes." Am J Phys Anthropol **98**(4): 395-401.
- Bianco, I., M. P. Cappabianca, et al. (1997). "Silent thalassemias: genotypes and phenotypes." Haematologica **82**(3): 269-80.
- Boemer, F., J. F. Vanbellinghen, et al. (2006). "Screening for sickle cell disease on dried blood: a new approach evaluated on 27,000 Belgian newborns." J Med Screen **13**(3): 132-6.
- Borges, E., M. R. Wenning, et al. (2001). "High prevalence of alpha-thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia." Braz J Med Biol Res **34**(6): 759-62.
- Borgna-Pignatti, C., F. Rigon, et al. (2003). "Thalassemia minor, the Gilbert mutation, and the risk of gallstones." Haematologica **88**(10): 1106-9.

- Brandelise, S., V. Pinheiro, et al. (2004). "Newborn screening for sickle cell disease in Brazil: the Campinas experience." Clin Lab Haematol **26**(1): 15-9.
- Bravin, C., S. Correia, et al. (2009). "Hemoglobinopatias na triagem neonatal do Espírito Santo - Abstract." Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia **31**(4): 55.
- Bunn, H. F. (1997). "Pathogenesis and treatment of sickle cell disease." N Engl J Med **337**(11): 762-9.
- Callegari-Jacques, S. M., D. Grattapaglia, et al. (2003). "Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population." Am J Hum Biol **15**(6): 824-34.
- Cao, A., R. Galanello, et al. (1994). "Genotype-phenotype correlations in beta-thalassemias." Blood Rev **8**(1): 1-12.
- Chui, D. H. and J. S. Waye (1998). "Hydrops fetalis caused by alpha-thalassemia: an emerging health care problem." Blood **91**(7): 2213-22.
- Colombo, B. and G. Martinez (1985). "Hemoglobin variants in Cuba." Hemoglobin **9**(4): 415-22.
- Crawford, D. C., M. Caggana, et al. (2002). "Characterization of beta-globin haplotypes using blood spots from a population-based cohort of newborns with homozygous HbS." Genet Med **4**(5): 328-35.
- Daudt, L. E., D. Zechmaister, et al. (2002). "Neonatal screening for hemoglobinopathies: a pilot study in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil." Cad Saude Publica **18**(3): 833-41.
- de Araujo, M. C., E. S. Serafim, et al. (2004). "Prevalence of abnormal hemoglobins in newborns in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil." Cad Saude Publica **20**(1): 123-8.
- Dickerhoff, R., O. Genzel-Boroviczeny, et al. (2009). "Haemoglobinopathies and newborn haemoglobinopathy screening in Germany." J Clin Pathol **62**(1): 34.
- Diniz, D., C. Guedes, et al. (2009). "Prevalence of sickle cell trait and sickle cell anemia among newborns in the Federal District, Brazil, 2004 to 2006." Cad Saude Publica **25**(1): 188-94.
- Eaton, W. A. and J. Hofrichter (1987). "Hemoglobin S gelation and sickle cell disease." Blood **70**(5): 1245-66.
- Farinon, J. (1992). Investigação de hemoglobinopatias em pacientes com anemia, eritrocitose e cianose. Curso de P s-Graduação em Genética e Biologia Molecular Porto Alegre, UFRGS. **Mestre em Genética**: 134.
- Faustino, P., P. Pacheco, et al. (1999). "The geographic pattern of beta-thalassaemia mutations in the Portuguese population." Br J Haematol **107**(4): 903-4.

- Ferrara, M., S. M. Matarese, et al. (2002). "Effect of VDR polymorphisms on growth and bone mineral density in homozygous beta thalassaemia." Br J Haematol **117**(2): 436-40.
- Figueiredo, M. S., J. Kerbauy, et al. (1996). "Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil." Am J Hematol **53**(2): 72-6.
- Flint, J., R. M. Harding, et al. (1998). "The population genetics of the haemoglobinopathies." Baillieres Clin Haematol **11**(1): 1-51.
- Foglietta, E., G. Deidda, et al. (1996). "Detection of alpha-globin gene disorders by a simple PCR methodology." Haematologica **81**(5): 387-96.
- Fowkes, F. J., S. J. Allen, et al. (2008). "Increased microerythrocyte count in homozygous alpha(+)-thalassaemia contributes to protection against severe malarial anaemia." PLoS Med **5**(3): e56.
- Freitas, E. M. and F. J. Rocha (1983). "Detection of beta-thalassemia heterozygotes among caucasians from Porto Alegre, RS, Brazil." Rev Bras Genet **6**: 185-188.
- Frempong, T. and H. A. Pearson (2007). "Newborn screening coupled with comprehensive follow-up reduced early mortality of sickle cell disease in Connecticut." Conn Med **71**(1): 9-12.
- Frenette, P. S. and G. F. Atweh (2007). "Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise." J Clin Invest **117**(4): 850-8.
- Galanello, R., S. Piras, et al. (2001). "Cholelithiasis and Gilbert's syndrome in homozygous beta-thalassaemia." Br J Haematol **115**(4): 926-8.
- Giardine, B., S. van Baal, et al. (2007). "HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations: 2007 update." Hum Mutat **28**(2): 206.
- Gimenez, O. G., M. C. Torrealba, et al. (2009). "Diagnosis of hemoglobinopathies in newborns in Venezuela hospitals." An Pediatr (Barc) **71**(4): 314-8.
- Giordano, P. C. (2009). "Starting neonatal screening for haemoglobinopathies in The Netherlands." J Clin Pathol **62**(1): 18-21.
- Gulbis, B., A. Ferster, et al. (2006). "Neonatal haemoglobinopathy screening: review of a 10-year programme in Brussels." J Med Screen **13**(2): 76-8.
- Hadachi, S., M. Iskandar, et al. (2009). "Triagem neonatal de hemoglobinopatias - Serviço de referência em triagem neonatal (SRTN) Apae de São Paulo - Abstract." Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia **31**(4): 54.
- Hagve, T. A., A. Asberg, et al. (2009). "Hemochromatosis--from an underdiagnosed curiosity to a common disease." Tidsskr Nor Laegeforen **129**(9): 863-6.
- Hanchard, N. A., I. Hambleton, et al. (2005). "The frequency of the sickle allele in Jamaica has not declined over the last 22 years." Br J Haematol **130**(6): 939-42.

- Harju, S., K. J. McQueen, et al. (2002). "Chromatin structure and control of beta-like globin gene switching." Exp Biol Med (Maywood) **227**(9): 683-700.
- Harju, S., P. A. Navas, et al. (2005). "Genome architecture of the human beta-globin locus affects developmental regulation of gene expression." Mol Cell Biol **25**(20): 8765-78.
- Hatton, C. S., A. O. Wilkie, et al. (1990). "Alpha-thalassemia caused by a large (62 kb) deletion upstream of the human alpha globin gene cluster." Blood **76**(1): 221-7.
- Hebbel, R. P. (1991). "Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology." Blood **77**(2): 214-37.
- Henthorn, J. S., A. M. Almeida, et al. (2004). "Neonatal screening for sickle cell disorders." Br J Haematol **124**(3): 259-63.
- Higgs, D. R., J. Lamb, et al. (1982). "Inadequacy of Hb Bart's as an indicator of alpha thalassaemia." Br J Haematol **51**(1): 177-8.
- Higgs, D. R., J. A. Sharpe, et al. (1998). "Understanding alpha globin gene expression: a step towards effective gene therapy." Semin Hematol **35**(2): 93-104.
- Higgs, D. R., M. A. Vickers, et al. (1989). "A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster." Blood **73**(5): 1081-104.
- Higgs, D. R. and D. J. Weatherall (2009). "The alpha thalassaemias." Cell Mol Life Sci **66**(7): 1154-62.
- Hoffman, R., E. J. Benz Jr, et al. (2000). Hematology - Basic Principles and Practice. New York, Chrchill Livingstone.
- Howard, J. and S. C. Davies (2007). "Sickle cell disease in North Europe." Scand J Clin Lab Invest **67**(1): 27-38.
- Jorge, S. E., E. M. Kimura, et al. (2007). "Three new alpha-globin variants: Hb Itapira [alpha30(B11)Glu-->Val (alpha1)], Hb Bom Jesus Da Lapa [alpha30(B11)Glu-->Ala (alpha1)] and Hb Boa Esperanca [alpha16(A14)Lys-->Thr (alpha2)]." Hemoglobin **31**(2): 151-7.
- Joutovsky, A., J. Hadzi-Nesic, et al. (2004). "HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies: a study of 60000 samples in a clinical diagnostic laboratory." Clin Chem **50**(10): 1736-47.
- Joyanes, B., M. Moro, et al. (2006). "Screening of hemoglobinopathies in a cohort of newborns in Madrid." Med Clin (Barc) **126**(8): 290-2.
- Kattamis, A. C., C. Camaschella, et al. (1996). "Human alpha-thalassemia syndromes: detection of molecular defects." Am J Hematol **53**(2): 81-91.
- Kattamis, C., H. Hu, et al. (1990). "Molecular characterization of beta-thalassaemia in 174 Greek patients with thalassaemia major." Br J Haematol **74**(3): 342-6.

- Kimura, E. M., D. M. Oliveira, et al. (2008). "Identificação e caracterização de variantes novas e raras da hemoglobina humana." Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia **30**(4): 316-319.
- King, L., R. Fraser, et al. (2007). "Newborn sickle cell disease screening: the Jamaican experience (1995-2006)." J Med Screen **14**(3): 117-22.
- Kleinert, P., M. Schmid, et al. (2008). "Mass spectrometry: a tool for enhanced detection of hemoglobin variants." Clin Chem **54**(1): 69-76.
- Kulozik, A. E., J. S. Wainscoat, et al. (1986). "Geographical survey of beta S-globin gene haplotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation." Am J Hum Genet **39**(2): 239-44.
- Lacerra, G., G. Fioretti, et al. (1991). "(Alpha)alpha 5.3: a novel alpha(+)-thalassemia deletion with the breakpoints in the alpha 2-globin gene and in close proximity to an Alu family repeat between the psi alpha 2- and psi alpha 1-globin genes." Blood **78**(10): 2740-6.
- Lapoumeroulie, C., O. Dunda, et al. (1992). "A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type." Hum Genet **89**(3): 333-7.
- Lee, A., P. Thomas, et al. (1995). "Improved survival in homozygous sickle cell disease: lessons from a cohort study." Bmj **311**(7020): 1600-2.
- Leite, F. P., S. M. Callegari-Jacques, et al. (2008). "Y-STR analysis in Brazilian and South Amerindian populations." Am J Hum Biol **20**(3): 359-63.
- Leite, F. P., S. E. Santos, et al. (2009). "Linkage disequilibrium patterns and genetic structure of Amerindian and non-Amerindian Brazilian populations revealed by long-range X-STR markers." Am J Phys Anthropol **139**(3): 404-412.
- Leonelli, G., R. Imperial, et al. (2000). "Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnóstica." Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia **22**(3): 396-403.
- Lerner, N. B., B. L. Platania, et al. (2009). "Newborn sickle cell screening in a region of Western New York State." J Pediatr **154**(1): 121-5.
- Liebhaber, S. A. (1989). "Alpha thalassemia." Hemoglobin **13**(7-8): 685-731.
- Lipinski-Figueiredo, E., S. Estelita, et al. (2009). "Dados preliminares da fase II do programa de triagem neonatal do estado de Alagoas - Abstract." Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia **31**(4): 62.
- Lisot, C. L. and L. M. Silla (2004). "Screening for hemoglobinopathies in blood donors from Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil: prevalence in an Italian colony." Cad Saude Publica **20**(6): 1595-601.
- Liu, L., S. Muralidhar, et al. (2009). "High-density SNP genotyping to define beta-globin locus haplotypes." Blood Cells Mol Dis **42**(1): 16-24.



- Lobo, C. L., L. M. Bueno, et al. (2003). "Neonatal screening for hemoglobinopathies in Rio de Janeiro, Brazil." Rev Panam Salud Publica **13**(2-3): 154-9.
- Luzzatto, L., E. S. Nwachuku-Jarrett, et al. (1970). "Increased sickling of parasitised erythrocytes as mechanism of resistance against malaria in the sickle-cell trait." Lancet **1**(7642): 319-21.
- Mackie, L. H. and R. M. Hochmuth (1990). "The influence of oxygen tension, temperature, and hemoglobin concentration on the rheologic properties of sickle erythrocytes." Blood **76**(6): 1256-61.
- Magalhaes, P. K., F. Turcato Mde, et al. (2009). "Neonatal screening program at the university hospital of the Ribeirao Preto School of Medicine, Sao Paulo University, Brazil." Cad Saude Publica **25**(2): 445-54.
- Manu Pereira Mdel, M., A. Cabot, et al. (2007). "Neonatal screening of hemoglobinopathies and G6PD deficiency in Catalonia (Spain). Molecular study of sickle cell disease associated with alpha thalassemia and G6PD deficiency." Med Clin (Barc) **129**(5): 161-4.
- Martins, C. S., A. S. Ramalho, et al. (1993). "Molecular characterisation of beta thalassaemia heterozygotes in Brazil." J Med Genet **30**(9): 797-8.
- Martins, R., I. Picanco, et al. (2004). "The role of HFE mutations on iron metabolism in beta-thalassemia carriers." J Hum Genet **49**(12): 651-5.
- May, J., J. A. Evans, et al. (2007). "Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria." Jama **297**(20): 2220-6.
- Michlitsch, J., M. Azimi, et al. (2009). "Newborn screening for hemoglobinopathies in California." Pediatr Blood Cancer **52**(4): 486-90.
- Modell, B. and M. Darlison (2008). "Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators." Bull World Health Organ **86**(6): 480-7.
- Modell, B., M. Darlison, et al. (2007). "Epidemiology of haemoglobin disorders in Europe: an overview." Scand J Clin Lab Invest **67**(1): 39-69.
- Moradkhani, K., C. Prehu, et al. (2009). "Mutations in the paralogous human alpha-globin genes yielding identical hemoglobin variants." Ann Hematol **88**(6): 535-43.
- Noguera, N. I., I. M. Bragos, et al. (1999). "Screening for hemoglobinopathies in neonates in Argentina." Haematologica **84**(5): 468-70.
- Old, J. M. (2007). "Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies." Scand J Clin Lab Invest **67**(1): 71-86.
- Oliveira, T. M., F. P. Souza, et al. (2006). "HFE gene mutations in Brazilian thalassemic patients." Braz J Med Biol Res **39**(12): 1575-80.

- Orlando, G., P. C. Naoum, et al. (2000). "Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas." Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia **22**(2): 111-121.
- Pagnier, J., J. G. Mears, et al. (1984). "Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(6): 1771-3.
- Paixao, M. C., M. H. Cunha Ferraz, et al. (2001). "Reliability of isoelectrofocusing for the detection of Hb S, Hb C, and HB D in a pioneering population-based program of newborn screening in Brazil." Hemoglobin **25**(3): 297-303.
- Parra, F. C., R. C. Amado, et al. (2003). "Color and genomic ancestry in Brazilians." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 177-82.
- Pedrollo, E., M. H. Hutz, et al. (1990). "Alpha thalassemia frequency in newborn children from Porto Alegre." Rev Bras Genet **13**(3): 573-581.
- Penalver, J. A. and M. S. de Miani (1974). "Hemoglobinopathy variants found in our area." Medicina (B Aires) **34**(4): 287-92.
- Peres, M. J., L. Romao, et al. (1995). "Molecular basis of alpha-thalassemia in Portugal." Hemoglobin **19**(6): 343-52.
- Quek, L. and S. L. Thein (2007). "Molecular therapies in beta-thalassaemia." Br J Haematol **136**(3): 353-65.
- Rahimy, M. C., A. Gangbo, et al. (2009). "Newborn screening for sickle cell disease in the Republic of Benin." J Clin Pathol **62**(1): 46-8.
- Ramalho, A. S., L. A. Magna, et al. (2003). "Government Directive MS # 822/01: unique aspects of hemoglobinopathies for public health in Brazil." Cad Saude Publica **19**(4): 1195-9.
- Reichert, V. C., S. M. de Castro, et al. (2008). "Identification of beta thalassemia mutations in South Brazilians." Ann Hematol **87**(5): 381-4.
- Ribeiro, D. M., T. R. Zaccariotto, et al. (2009). "Influence of the polymorphisms of the alpha-major regulatory element HS-40 on in vitro gene expression." Braz J Med Biol Res **42**(9): 783-6.
- Ribeiro, M. L., P. Goncalves, et al. (1997). "Genetic heterogeneity of beta-thalassemia in populations of the Iberian Peninsula." Hemoglobin **21**(3): 261-9.
- Rund, D. and S. Fucharoen (2008). "Genetic modifiers in hemoglobinopathies." Curr Mol Med **8**(7): 600-8.
- Rund, D. and E. Rachmilewitz (2005). "Beta-thalassemia." N Engl J Med **353**(11): 1135-46.
- Salzano, F. M. (2000). "Permanence or change? The meaning of genetic variation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5317-21.

- Salzano, F. M. and M. C. Bortolini (2002). The evolution and genetics of Latin American populations. Cambridge, Cambridge University Press.
- Salzano, F. M., F. J. Da Rocha, et al. (1968). "Hemoglobin types and gene flow in Porto Alegre, Brazil." Acta Genet Stat Med **18**(5): 449-57.
- Saúde, M. d. (2010). "Indicadores do Programa Nacional de Triagem Neonatal. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id\\_area=1061](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1061)."
- Seid-Akhavan, M., M. Ayres, et al. (1973). "Two more examples of Hb Porto Alegre, alpha-2 beta-2 9 Ser leads to Cys in Belem, Brazil." Hum Hered **23**(2): 175-81.
- Serjeant, G. R. (2000). "Screening for sickle-cell disease in Brazil." Lancet **356**(9224): 168-9.
- Sonati, M. F. and F. F. Costa (1990). "Hemoglobin Bart's in a Brazilian black population." Braz J Med Biol Res **23**(5): 395-6.
- Sonati, M. F., S. B. Farah, et al. (1991). "High prevalence of alpha-thalassemia in a black population of Brazil." Hemoglobin **15**(4): 309-11.
- Souza, A. E., G. L. Cardoso, et al. (2009). "Alpha-thalassemia (3.7 kb deletion) in a population from the Brazilian Amazon region: Santarem, Para State." Genet Mol Res **8**(2): 477-81.
- Souza, C. F. M. d., I. V. Schwartz, et al. (2002). "Triagem neonatal para distúrbios metabólicos." Ciência & Saúde Coletiva **71**(1): 129-137.
- Spritz, R. A. and B. G. Forget (1983). "The thalassemias: molecular mechanisms of human genetic disease." Am J Hum Genet **35**(3): 333-61.
- Steinberg, M. H., M. B. Coleman, et al. (1986). "A new gene deletion in the alpha-like globin gene cluster as the molecular basis for the rare alpha-thalassemia-1(-/-alpha alpha) in blacks: HbH disease in sickle cell trait." Blood **67**(2): 469-73.
- Streetly, A., R. Latinovic, et al. (2009). "Implementation of universal newborn bloodspot screening for sickle cell disease and other clinically significant haemoglobinopathies in England: screening results for 2005-7." J Clin Pathol **62**(1): 26-30.
- Suemasu, C. N., E. M. Kimura, et al. (2009). "Caracterização de cinco novas deleções alfa-talassêmicas por MLPA." Resumos do 55 Congresso Brasileiro de Genética.
- Tantawy, A. A., M. El Kholly, et al. (2008). "Bone mineral density and calcium metabolism in adolescents with beta-thalassemia major." Pediatr Endocrinol Rev **6 Suppl 1**: 132-5.
- Telfer, P., P. Coen, et al. (2007). "Clinical outcomes in children with sickle cell disease living in England: a neonatal cohort in East London." Haematologica **92**(7): 905-12.

- Thein, S. L. (2002). "Beta-thalassaemia prototype of a single gene disorder with multiple phenotypes." Int J Hematol **76 Suppl 2**: 96-104.
- Thein, S. L. (2004). "Genetic insights into the clinical diversity of beta thalassaemia." Br J Haematol **124**(3): 264-74.
- Thein, S. L. (2005). "Genetic modifiers of beta-thalassemia." Haematologica **90**(5): 649-60.
- Theodorsson, E., H. Birgens, et al. (2007). "Haemoglobinopathies and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in a Scandinavian perspective." Scand J Clin Lab Invest **67**(1): 3-10.
- Tondo, C. V., F. M. Salzano, et al. (1963). "Hemoglobin Porto Alegre, a possible polymer of normal hemoglobin in a Caucasian Brazilian family." Am J Hum Genet **15**: 265-79.
- Tshilolo, L., L. M. Aissi, et al. (2009). "Neonatal screening for sickle cell anaemia in the Democratic Republic of the Congo: experience from a pioneer project on 31 204 newborns." J Clin Pathol **62**(1): 35-8.
- Vichinsky, E., D. Hurst, et al. (1988). "Newborn screening for sickle cell disease: effect on mortality." Pediatrics **81**(6): 749-55.
- Vichinsky, E. P. (1991). "Comprehensive care in sickle cell disease: its impact on morbidity and mortality." Semin Hematol **28**(3): 220-6.
- Viprakasit, V., C. L. Harteveld, et al. (2006). "A novel deletion causing alpha thalassemia clarifies the importance of the major human alpha globin regulatory element." Blood **107**(9): 3811-2.
- Wagner, S. C., C. Pereira, et al. (2006). "Association of Hb Shelby with Hb S in the south of Brazil." Haematologica **91**(8): 1141-2.
- Wainscoat, J. S., J. I. Bell, et al. (1983). "Multiple origins of the sickle mutation: evidence from beta S globin gene cluster polymorphisms." Mol Biol Med **1**(2): 191-7.
- Wallace, H. A., F. Marques-Kranc, et al. (2007). "Manipulating the mouse genome to engineer precise functional syntenic replacements with human sequence." Cell **128**(1): 197-209.
- Watanabe, A. M., M. A. Pianovski, et al. (2008). "Prevalence of hemoglobin S in the State of Parana, Brazil, based on neonatal screening." Cad Saude Publica **24**(5): 993-1000.
- Waye, J. S. and D. H. Chui (2001). "The alpha-globin gene cluster: genetics and disorders." Clin Invest Med **24**(2): 103-9.
- Weatherall, D. J. and J. B. Clegg (1981). The Thalassaemia Syndromes. Oxford, Blackwell Scientific Publications.

- Weatherall, D. J. and J. B. Clegg (1999). "Genetic disorders of hemoglobin." Semin Hematol **36**(4 Suppl 7): 24-37.
- Weatherall, D. J. and A. B. Provan (2000). "Red cells I: inherited anaemias." Lancet **355**(9210): 1169-75.
- Weimer, T. A., F. M. Salzano, et al. (1981). "Erythrocyte isozymes and hemoglobin in a Southern Brazilian population." J Human Evolution **10**: 319-328.
- WHO, W. G. (1982). "Hereditary anaemias: genetic basis, clinical features, diagnosis, and treatment. WHO working group." Bull World Health Organ **60**(5): 643-60.
- Yorke, D., J. Mitchell, et al. (1992). "Newborn screening for sickle cell and other hemoglobinopathies: a Canadian pilot study." Clin Invest Med **15**(4): 376-83.
- Zago, M. A., F. F. Costa, et al. (1983). "Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population." Hum Hered **33**(2): 125-9.
- Zembruski, V. M., S. M. Callegari-Jacques, et al. (2006). "Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population." Ann Hum Genet **70**(Pt 6): 822-8.



## Anexo I

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Número: \_\_\_\_\_

Prezado Sr. /Sra.

Como é do seu conhecimento, o Sr./Sra. está em investigação de hemoglobinopatias. As hemoglobinopatias são um grupo de alterações hereditárias, ou seja, que passam de pais para filhos e que podem ser silenciosas ou 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 mais graves como fraqueza, falta de ar, sonolência e infecções, entre outros.

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 que possuem estas alterações no nosso Estado. 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 gerarem filhos também afetados. Cabe explicar que um casal de portadores de hemoglobinopatias tem um risco de, aproximadamente, 50%, isto é, uma chance de 1 em cada 2, de gerar uma criança com esta mesma condição.

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

Estas amostras de sangue serão analisadas para que sejam identificados possíveis portadores de hemoglobinas variantes, talassemia  $\beta$  ou talassemia  $\alpha$ . Algumas destas alterações só podem ser identificadas com o uso de técnicas mais sofisticadas que usem o DNA, que é o material genético.

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. Além disso, a quantidade de sangue coletada não fará falta alguma ao paciente.

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.

Caso sejam detectadas alterações compatíveis com as hemoglobinopatias, o resultado do exame será enviado para o seu médico ou posto de saúde.

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.

( ) Concordo com a coleta de sangue e a utilização do material obtido.

\_\_\_\_\_  
Paciente

\_\_\_\_\_  
Pesquisador

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

Telefone para esclarecimentos: 0 XX 51-3308-5257



**Anexo II**  
**Association of Hb Shelby with Hb S in the south of Brazil**