

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

MICHELLE FREITAS MARTINS

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, HEMATOLÓGICA E MOLECULAR
DOS ADULTOS COM β TALASSEMIA NO CEARÁ

FORTALEZA

2010

MICHELLE FREITAS MARTINS

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, HEMATOLÓGICA E MOLECULAR DOS
ADULTOS COM β TALASSEMIA NO CEARÁ

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Ceará, Curso de Pós-Graduação em Patologia, como requisito final para obtenção do título de mestre em Patologia.

Orientadora: Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves
Co-orientadora: Dra. Paula Juliana Antoniazio Zamaro

FORTALEZA
2010

M344c Martins, Michelle Freitas
Caracterização clínica, hematológica e molecular dos adultos com β Talassemia no Ceará./ Michelle Freitas Martins. – Fortaleza, 2010.
83 f.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Romélia Pinheiro Gonçalves
Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza-Ce, 2010.

1. Talassemia beta. 2. Fenótipo. 3. Genótipo. 4. Mutação. I. Gonçalves, Romélia Pinheiro (Orient.) II. Título.

CDD 616.152

MICHELLE FREITAS MARTINS

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, HEMATOLÓGICA E MOLECULAR DOS ADULTOS
COM β TALASSEMIA NO CEARÁ

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Ceará, Curso de Pós-Graduação em Patologia, como
requisito final para obtenção do título de mestre em Patologia.

Aprovado em: ____/____/2010

BANCA EXAMINADORA

Dra. Cláudia Regina Bonini-Domingos
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP

Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dr. Ronald Pinheiro Feitosa
Universidade Federal do Ceará - UFC

ORIENTAÇÃO

Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves
Universidade Federal do Ceará - UFC

Aos meus pais, Gilvan e Neira, por nunca medirem esforços para me ajudar, incentivo e apoio em todas as etapas da minha vida. Pelo grande amor e por serem essenciais na minha vida.

Ao meu esposo, Thiago Yann, pelo estímulo, paciência e muito amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus pelo dom da vida e por estar sempre guiando meus passos.

À minha orientadora, Professora Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves, pela oportunidade e honra que me deu de ser sua aluna, pela confiança, amizade, e por tudo que me ensinou nesses anos de convivência.

À Professora Dra. Silvia Helena por colocar seu laboratório (LABGEM) à disposição para aprendizado e realização de parte das metodologias, e pela valiosa colaboração.

À Dra. Paula Juliana Antoniazco Zamaro, minha co-orientadora, por ter ajudado na realização deste trabalho, pela hospitalidade, amizade e por tudo que me ensinou.

À Professora Dra. Cláudia Regina Bonini-Domingos, pela imensa ajuda, por ter cedido seu laboratório para aprendizado e realização das metodologias.

A todos os alunos do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) pelo carinho, auxílios técnicos e científicos na realização deste trabalho.

À Professora Margarida Pompeu, aos demais membros da coordenação do mestrado em Patologia, e a todos os professores pela dedicação aos mestrandos e empenho em tornar o mestrado ainda melhor.

Às minhas amigas e companheiras mestrandas Lilianne Brito, Bruna Stefania e Maritza por todo apoio e ajuda que me proporcionaram.

À Valeska, Markênia, Isabelli, Ana Paula, Marcelo, Aracélia, Débora, Vilena, Rita, Renata e aos demais alunos do Laboratório de Genética (LABGEM) do Departamento de Medicina pela ajuda, apoio e conhecimentos compartilhados.

À Cecília Saunders e aos demais mestrandos em Patologia pelo carinho, amizade e os desafios que enfrentamos juntos.

À minha mãe Neira Lúcia e meu pai Gilvan Rodrigues, meus exemplos de vida, sempre presentes trilhando meus caminhos até aqui. Ao meu irmão Mychel Edelberto e minha cunhada Edna, pelo apoio e carinho.

A meu tio Luís Nelson que é uma pessoa indispensável no meu aprendizado.

Aos meus sogros e cunhados por todo carinho, amor e incentivo a mim dispensados.

Ao meu esposo, pelo amor, carinho, principalmente compreensão e paciência. Por estar sempre presente em todos os momentos e em qualquer situação.

A toda equipe de coleta do Hemoce. Em especial, à Fátima, sempre prestativa, por toda disposição, ajuda e simpatia.

À Helena Carmen pela compreensão, apoio e amizade durante todo o mestrado.

RESUMO

Introdução: A beta talassemia é um grupo de distúrbios, cada um resultando de um defeito genético, na velocidade de síntese de uma ou mais cadeias globínicas da hemoglobina (Hb). A desproporção na produção das cadeias globínicas pode resultar em eritropoese ineficaz, produção insuficiente de Hb, hemólise e anemia de grau variado. A beta talassemia é mais frequente nos países banhados pelo mar Mediterrâneo, refletindo a participação desses povos na formação da população brasileira. As mutações predominantes no Brasil são a IVS-I-1, IVS-I-6, IVS-I-110 e o CD 39, as quais estão associadas a diversos quadros clínicos e são, em sua maioria, regionalmente específicas. **Objetivo:** Caracterizar o perfil clínico, hematológico e molecular dos indivíduos adultos com beta talassemia do Hospital Universitário Walter Cantúdeo, em acompanhamento no centro de referência de Hematologia e Hemoterapia do estado do Ceará (HEMOCE). **Metodologia:** Foram analisados 22 indivíduos portadores de beta talassemia, sendo 7 intermediária e 15 menor, de ambos os sexos, no período de fevereiro de 2008 a setembro de 2009. **Os dados clínicos e laboratoriais:** hemograma, níveis de Hb A₂ e de Hb F; ferro sérico; capacidade total e latente de ligação do ferro (CTLFe, CLLFe), ferritina e índice de saturação da transferrina (IST), foram obtidos dos prontuários, ao diagnóstico. Cerca de 5 mL de sangue venoso foi coletado em tubo contendo o anticoagulante EDTA para o estudo molecular. A análise das mutações foi realizada por meio da técnica da reação em cadeia mediada pela polimerase alelo específico (PCR-AE), onde foram analisadas as seguintes mutações: IVS-I-1, IVS-I-6, IVS-I-110 e o CD 39. As análises estatísticas foram desenvolvidas no software livre R (versão 2.7.0) e o nível de significância estabelecido foi 5%. **Resultados:** Dos 22 pacientes estudados, 15 eram portadores de β talassemia menor e sete intermediária. A idade variou de 18 a 68 anos, com média de 44,7 anos. 18,2 % do sexo masculino e 81,8% do sexo feminino. As mutações foram caracterizadas em 68,2% dos casos, que teve como mais frequente a IVS-I-6, seguida do códon 39. A mutação IVS-I-I foi caracterizada em um paciente e a IVS-I-110 não foi encontrada. Não houve diferença clínica significativa entre os parâmetros hematológicos e bioquímicos. Houve discrepância entre o fenótipo e o genótipo em alguns pacientes, porém não houve diferença significativa entre as mutações e as manifestações clínicas. **Conclusões:** Os resultados do presente estudo reforçam o predomínio da mutação IVS-I-6 no nordeste do Brasil. Recomendam-se estudos posteriores para investigação da co-herança com a α talassemia nesses pacientes para justificar a discrepância entre genótipos e fenótipos.

Palavras-chave: Talassemia beta, Fenótipo, Genótipo, Mutação.

ABSTRACT

Background: Beta thalassemia is a group of disorders, each resulting from a genetic defect in the rate of synthesis of one or more globin chains of hemoglobin (Hb). The imbalance in the production of globin chains can result in ineffective erythropoiesis, insufficient production of hemoglobin, hemolysis and anemia of varying degree. Beta thalassemia is more common in countries bordering the Mediterranean Sea, reflecting the participation of these peoples in the formation of the Brazilian population. The predominant mutations in Brazil are the IVS-I-1, IVS-I-6, IVS-I-110 and CD 39, which are associated with different clinical conditions and are mostly regionally specific. **Objective:** To characterize the clinical, hematological and molecular adults with beta thalassemia of the University Hospital Cantídeo Walter and followed at a referral center for Hematology of the state of Ceará (Hemoce). **Methods:** We analyzed 22 individuals with beta thalassemia, 7 intermediate and 15 minor, in both sexes, from February 2008 to September 2009. Clinical data and laboratory tests: blood count, levels of Hb A₂ and Hb F, serum iron, total capacity and latent iron binding (CTLFe, CLLFe), ferritin and transferrin saturation index (IST) were obtained from medical records, diagnosis. About 5 mL of venous blood was collected in tubes containing EDTA anticoagulant for molecular study. The analysis of mutations was performed using the technique of chain reaction mediated by allele specific polymerase (PCR-AE), where we analyzed the following mutations: IVS-I-1, IVS-I-6, IVS-I-110 and CD 39. Statistical analysis was carried out in software R (version 2.7.0) and the level of significance was 5%. **Results:** Of 22 patients studied, 15 were patients with β thalassemia minor and seven intermediate. The age ranged 18-68 years with a mean of 44.7 years. 18.2% male and 81.8% female. The mutations were characterized in 68.2% of cases, which had the most frequent IVS-I-6, followed by the codon 39. The mutation IVS-I-1 was found in one patient and IVS-I-110 was not found. There was no significant clinical differences between the hematological and biochemical parameters. There was a discrepancy between phenotype and genotype in some patients, but no significant difference between mutations and clinical manifestations. **Conclusions:** The results of this study reinforce the dominance of the mutation IVS-I-6 in northeastern Brazil. Are recommended further studies to investigate the co-inheritance with α -thalassemia in these patients to justify the discrepancy between genotypes and phenotypes.

Keywords: Beta thalassemia, Phenotype, Genotype, Mutation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Hemoglobina humana normal (Hb A)	16
Figura 2	Representação dos <i>locis</i> dos genes da globina α e dos genes da globina β humana	18
Figura 3	O conjunto do gene β globina e as suas regiões flanqueando o cromossomo 11p. B. Estrutura geral do gene da globina β	24
Figura 4	Diferentes mecanismos moleculares que causam β talassemia	25
Figura 5	Distribuição global das mutações na beta talassemia	29
Figura 6	Representação esquemática da fisiopatologia da β talassemia	34
Figura 7	Representação esquemática do delineamento do estudo	42
Figura 8	Representação esquemática da localização dos <i>primers</i> no gene da globina beta humana	45
Figura 9	Box-Plot da idade dos indivíduos portadores de beta talassemia	50
Figura 10	Idade (em anos) dos portadores de beta talassemia segundo sua classificação clínica	51
Figura 11	Foto de um gel de agarose 1,5% com amostra de heterozigoto para a mutação IVS-I-1 no indivíduo de número 11	54
Figura 12	Foto de um gel de agarose 1,5% com amostra de homozigoto para a mutação IVS-I-6 no indivíduo de número 13	54
Figura 13	Foto de um gel de agarose 1,5% com amostra de heterozigoto para a mutação CD 39 no indivíduo de número 7	55
Figura 14	Foto de um gel de agarose 1,5% com amostra sem o alelo mutante para a mutação IVS-I-110	55
Figura 15	Boxplot dos valores dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e níveis de Hb F e Hb A ₂ nos portadores de beta talassemia, ao diagnóstico, de acordo com o tipo de mutação	56
Figura 16	Boxplot dos valores dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e níveis de Hb F e Hb A ₂ nos pacientes com β talassemia, ao diagnóstico, de acordo com o genótipo dos pacientes com mutação IVS-I-6	57
Quadro 1	Ontogenia das hemoglobinas	20
Quadro 2	Distribuição das mutações beta talassemia em alguns países do Mediterrâneo.....	29
Quadro 3	<i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR-AE para determinação de mutações	

nos genes da beta globina 46

LISTA DE TABELAS

1. Estratificação das características demográficas dos indivíduos portadores de beta talassemia e associação com a classificação clínica (n=22)	49
2. Características demográficas, hematológicas nos portadores de beta talassemia menor (n=15), ao diagnóstico, com o estudo molecular	52
3. Características demográficas, hematológicas nos portadores de beta talassemia intermediária (n=7), ao diagnóstico, com o estudo molecular	52
4. Distribuição dos pacientes β talassêmicos quanto ao tipo de mutação e o fenótipo	53
5. Comparação das mutações IVS I-6 e CD 39 com as manifestações clínicas, ao diagnóstico	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRASTA	Associação Brasileira de Talassemia
ATP	Adenosina tri-fosfato
CD	códon
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CTLFe	Capacidade total de ligação do ferro
CLLFe	Capacidade latente de ligação do ferro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Etileno-diamino-tetracético
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina tipo A
HbA	Hemoglobina A1 do adulto
HbA ₂	Hemoglobina A2 do adulto
HbC	Hemoglobina C
HbE	Hemoglobina E
HbF	Hemoglobina F
HbS	Hemoglobina S
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HEMOCE	Hemocentro do Ceará
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IVS	Íntron
Kb	Kilobases
KD	Kilodáltons
LCR	Região controladora do locus da globina β (<i>Locus Region Control</i>)
LABGEM	Laboratório de Genética Molecular
LHGDH	Laboratório de Hemoglobinas e Genética de Doenças Hematológicas
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PCR-AE	Reação em cadeia de polimerase alelo específico
PHHF	Persistência hereditária da hemoglobina fetal
RNA	Ácido ribonucléico

RNA _m	RNA mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UNESP	Universidade Estadual de São Paulo
UTR	Região não traduzida
UV	Ultravioleta
VCM	Volume corpuscular médio

LISTA DE SÍMBOLOS

α - alfa

β -beta

δ -delta

ε -épsilon

γ -gama

ζ - zeta

Θ - teta

α^1 - alfa 1

α^2 - alfa 2

$\psi \alpha^1$ - pseudogene alfa 1

$\psi \alpha^2$ - pseudogene alfa 2

$\psi \beta$ - pseudogene beta

$\psi \zeta^1$ - pseudogene zeta

γ^A - gama adenina

γ^G - gama glicina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	A molécula de hemoglobina	16
1.1.1	Os genes da hemoglobina	17
1.1.2	Ontogenia das hemoglobinas	19
1.1.3	Hemoglobinopatias.....	20
1.2	Talassemias	21
1.3	Beta talassemia	22
1.3.1	Bases moleculares da beta talassemia.....	23
1.3.2	Mutações.....	28
1.3.3	Fisiopatologia.....	30
1.3.4	Formas clínicas	34
2	OBJETIVOS	40
2.1	Objetivo geral	40
2.2	Objetivos específicos	40
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	Casuística	41
3.2	Metodologia	41
3.2.1	Coleta das amostras	42
3.2.2	Dados hematológicos e bioquímicos.....	43
3.2.3	Determinação dos níveis de Hb F e Hb A ₂	43
3.2.4	Análises moleculares	44
3.2.5	Análise estatística	48
4	RESULTADOS	49
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXOS	79
	APÊNDICE	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 A molécula da hemoglobina

A molécula da hemoglobina (Hb), que é o pigmento que se encontra no interior do glóbulo vermelho, é uma proteína de estrutura globular e quaternária composta por quatro cadeias polipeptídicas, denominadas globínicas, e um grupo prostético. A forma mais comum e abundante de hemoglobina humana, a Hb A (hemoglobina do adulto), é constituída por duas cadeias globínicas do tipo *alfa* (com 141 aminoácidos cada) e por duas do tipo *beta* (com 146 aminoácidos cada). Cada cadeia polipeptídica contém um grupo prostético contendo um grupamento heme, complexo formado por um átomo de ferro em uma estrutura porfirínica. Estruturalmente, os quatros monômeros ligam-se compondo dímeros que se unem para formar o tetrâmero da hemoglobina (HONIG; ADAMS III, 1986; TORRES; BONINI-DOMINGOS, 2005) (Figura 1).

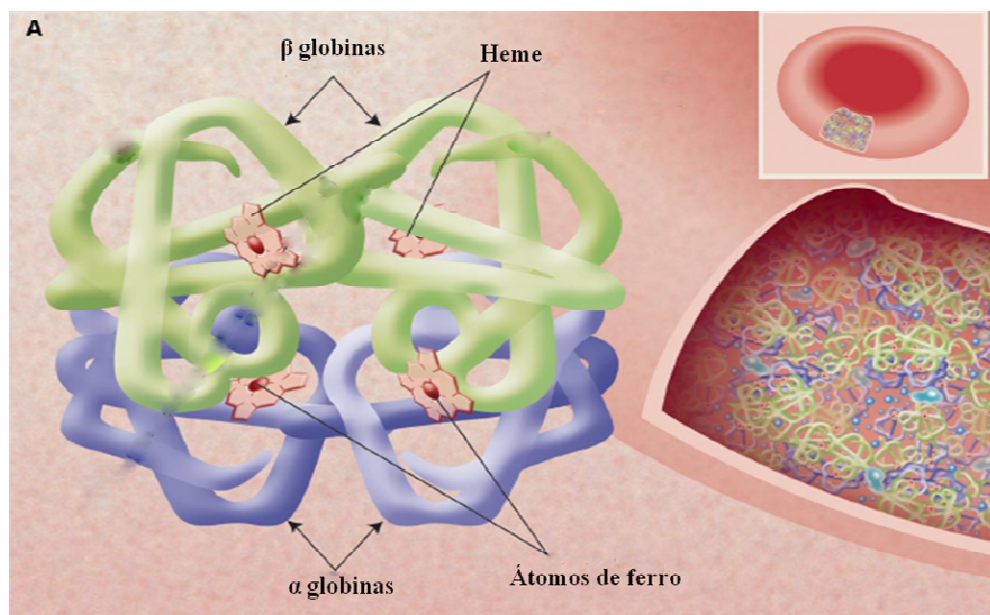


Figura 1- Hemoglobina humana (Hb A). (A) Esta proteína é formada por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias *alfa* (azul), com 141 resíduos de aminoácidos e duas cadeias *betas* (verde) com 146 resíduos de aminoácidos. Cada cadeia polipeptídica contém um grupo prostético heme ao qual se liga o O_2 e um átomo de ferro.

Fonte: Adaptado de Schechter, 2008.

A hemoglobina tem peso molecular aproximadamente de 64 kilodáltons (KD), representando 95% das proteínas dos eritrócitos. Sua principal função, em mamíferos, é a absorção, o transporte e a distribuição de oxigênio para os diversos tecidos do organismo. Além da importante atividade antioxidante, a molécula de hemoglobina também interage com três outros gases, o dióxido de carbono (CO₂), monóxido de carbono (CO), e óxido nítrico (NO), que têm importantes funções biológicas (BUNN; FORGET, 1986; MACKA; KATOA, 2006; SCHECHTER, 2008).

1.1.1 Os genes da hemoglobina

As subunidades das hemoglobinas são codificadas por um pequeno grupo de genes (α e β) que são expressos sequencialmente durante o desenvolvimento humano. Os genes do agrupamento ou "cluster" estão reunidos no braço curto do cromossomo 16, em uma região aproximadamente de 25 Kb (ANTONARAKIS; KAZAZIAN JÚNIOR; ORKIN, 1985; HONIG; ADAMS III, 1986). Neste complexo gênico existem dois genes estruturais que expressam as globinas alfa denominados de α_1 e α_2 . Outros genes pertencentes a este complexo gênico são os genes *zeta*, de atuação na fase embrionária, e os pseudogenes *psi alfa 1* ($\psi\alpha 1$) e *psi zeta* ($\psi\zeta$). Pseudogenes são genes que possuem sequências homólogas aos genes estruturais ativos, mas contêm mutações que inibem sua expressão (BONINI-DOMINGOS, 2006). Os genes do agrupamento β estão localizados no braço curto do cromossomo 11, em uma região de aproximadamente 50 Kb. Os genes épsilon (ϵ) são expressos na fase embrionária, os genes gama-alanina (γ^A) e gama-glicina (γ^G) são característicos do período fetal. Os genes β e δ são atuantes a partir do final do período fetal e se expressam completamente no período pós-nascimento (ANTONARAKIS; KAZAZIAN JÚNIOR; ORKIN, 1985).

Os genes do "cluster" β são constituídos por um segmento na região promotora 5', uma pequena região não traduzida (UTR), códons de iniciação, éxons, íntrons (IVS), códon de terminação, uma UTR 3' e sinal de poliadenilação em uma região de 1.587pb (HUISMAN; CARVER; BAYSAL, 1997) (Figura 2).

A região promotora do gene β globina apresenta várias sequências de nucleotídeos conservados e aparentemente envolvidos no controle da transcrição. A primeira é caracterizada por ser rica em nucleotídeos adenina e timina, sendo denominada TATA Box. A

segunda sequência conservada é constituída de nucleotídeos GGC/TCAATCT, denominada CAT Box, e encontra-se duplicada nos genes γ , e a sequência CCACCCT, duplicada no gene β (BENOIST *et al.*, 1980; EFSTRADIADIS *et al.*, 1980; DIERKS *et al.*, 1981; CHARNAY; MELLON; MANIATTIS, 1985).

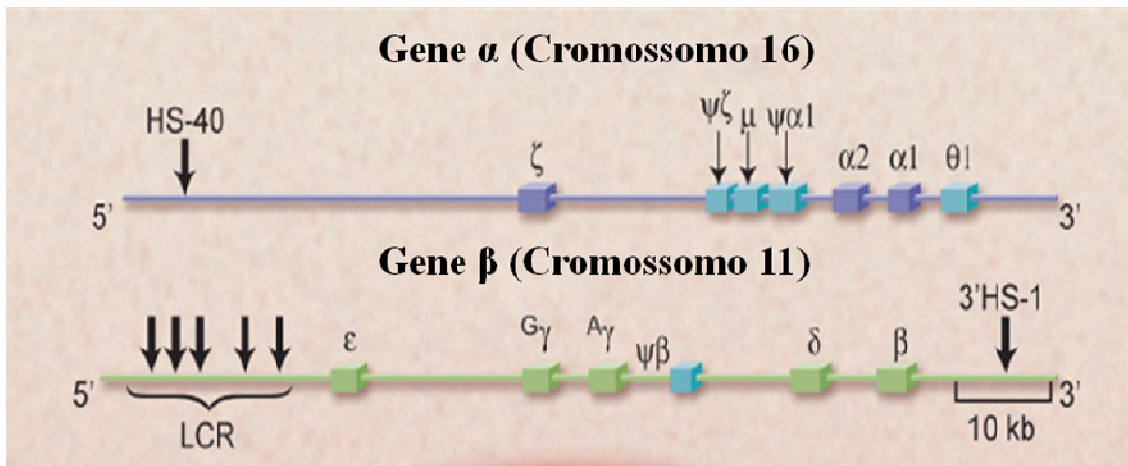


Figura 2- Representação dos *locis* dos genes da globina α localizado no cromossomo 16p13.3 e dos genes da globina β humana localizado no cromossomo 11p15.5. Os genes funcionais são mostrados em azul escuro no gene α , em verde no gene β e os pseudogenes em azul claro.

Fonte: Adaptado de Schechter, 2008.

A síntese da hemoglobina é determinada por um sistema complexo de regulação que envolve mecanismos sequenciais de ativação e inativação, resultando na síntese das diferentes cadeias globínicas. Os mecanismos de regulação envolvidos são as interações de fatores transcricionais em estágios específicos, a região controladora do *locus* (LCR) no grupo de genes β , a presença de sítios hipersensíveis à DNase I (HS-40) no grupo de genes α , as sequências cis que atuam positiva ou negativamente na regulação da transcrição e os fatores de transcrição eritróides ou não-eritróides possam estar envolvidos (NAGEL; STEINBERG, 2001; STAMATOYANNOPOULOS, 2005; BANK, 2006; MAHAJAN; WEISSMAN, 2006; ADORNO *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2009).

1.1.2 Ontogenia das hemoglobinas

As hemoglobinas diferenciam-se entre si por possuírem características físico-químicas e mobilidades eletroforéticas distintas. A primeira hemoglobina embrionária sintetizada é a Hb Gower 1 ($\epsilon_2\zeta_2$) e predomina nas quatro semanas iniciais. Aproximadamente no início da oitava semana de gestação, as cadeias produzidas são gradualmente substituídas pela cadeia α e duas diferentes cadeias fetais designadas $G\gamma$ e $A\gamma$. Os genes γ diferem somente pela presença de glicina ou alanina na posição 136, respectivamente. Durante o período de transição entre o estágio embrionário e fetal, as hemoglobinas Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland ($\zeta_2\gamma_2$) são detectadas. Após o período embrionário não ocorre mais a síntese das hemoglobinas embrionárias que, no entanto, podem estar presentes, em pequenas quantidades em recém-nascidos normais (WEATHERALL; CLEGG, 1981; ANTONARAKIS; KAZAZIAN JÚNIOR; ORKIN, 1985; HONIG; ADAMS III, 1986).

Ainda no período embrionário a hemoglobina fetal - HbF ($\alpha_2\gamma_2$) substituirá gradativamente as hemoglobinas embrionárias, atingirá a sua plenitude por volta do terceiro mês de gestação e torna-se predominante ao longo do período fetal. A hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$) começa a ser sintetizada a partir da décima semana, mantendo-se em níveis não superiores a 10%, na trigésima semana. Logo após o nascimento, as HbF e HbA apresentam concentrações próximas de 80% e 20% respectivamente, e as sínteses invertem-se rapidamente até estabilizarem-se, em média, no sexto mês de vida pós-natal. A Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) tem sua síntese iniciada no final do período fetal, e se estabiliza no mesmo período que a HbF e HbA₂. O perfil eletroforético de 96 a 98% de HbA, 2 a 3.5% de HbA₂ e 0 a 1% de HbF se estabiliza por volta do 6^o mês após o nascimento (WEATHERALL; CLEGG, 1981; ANTONARAKIS; KAZAZIAN JÚNIOR; ORKIN, 1985; HONIG; ADAMS III, 1986) (Quadro 1).

Quadro 1. Ontogenia das hemoglobinas

PERÍODO	TIPO DE HEMOGLOBINA	CONCENTRAÇÃO (%)
Embrionário	Gower-1 ($\epsilon 2 \zeta 2$)	20-40
	Portland ($\zeta 2 \gamma 2$)	5-20
	Gower-2 ($\alpha 2 \epsilon 2$)	10-20
Fetal	Fetal ($\alpha 2 \gamma 2$)	80-100
	A ($\alpha 2 \beta 2$)	5-10
	A2 ($\alpha 2 \delta 2$)	Traços
Pós-nascimento após 6 meses de idade	A ($\alpha 2 \beta 2$)	96-98
	A2 ($\alpha 2 \delta 2$)	2-3,5
	Fetal ($\alpha 2 \gamma 2$)	0-1,0

FONTE: Adaptado de Naoum, 1997

1.1.3 Hemoglobinopatias

As alterações das hemoglobinas humanas, denominados de hemoglobinopatias, são de importância fundamental na genética médica, pois são as doenças monogênicas mais comuns no mundo, causando morbidade substancial. Podem ser divididos em três grupos: variantes estruturais (alteram o polipeptídeo da globina, sem afetar sua taxa de síntese); talassemias (síntese diminuída de uma ou mais cadeias de globina, resultando no desequilíbrio das quantidades relativas das cadeias alfa e β); persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF) (grupo de condições clinicamente benignas que alteram a mudança perinatal de síntese de γ para β -globina) (WATANABE, 2007).

As hemoglobinas anormais ou variantes apresentam estrutura química diferente da hemoglobina normal e são resultantes de mutações em bases nitrogenadas que podem levar à substituição de aminoácidos nas globinas α , β , δ ou γ (NAOUM, 1999) e, por isso são chamadas de variantes. Atualmente existem 1.034 variantes de hemoglobinas descritas e algumas com consequências fisiopatológicas ao portador (<http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>; Acesso em: 10 de abril de 2010), que segundo suas características funcionais, podem ser classificadas em cinco grupos: Grupo I (hemoglobinas sem alterações fisiológicas); Grupo II (hemoglobinas de agregação); Grupo III (hemoglobinas instáveis);

Grupo IV (hemoglobinas com alterações funcionais) e Grupo V (hemoglobinas variantes com fenótipo talassêmico) (HUISMAN *et al.*, 2001).

Entre as hemoglobinas variantes mais frequentes encontram-se as hemoglobinas S, C, D e E (WEATHERALL; PROVAN, 2000; BUNN, 1997; OLD, 2003). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças da hemoglobina estão atualmente presentes em 71% de 229 países. Estima-se que 5% da população mundial sejam portadora dos genes da hemoglobina S (HbS) e de talassemias (MODELL; DARLISON, 2008).

1.2 Talassemias

As talassemias são caracterizadas por redução na produção de uma ou mais cadeias polipeptídicas que formam o tetrâmero de hemoglobina, resultando geralmente, no desenvolvimento de anemia microcítica e hipocrômica. Os defeitos moleculares podem afetar a síntese das cadeias alfa, beta, delta ou gama, sendo que as alterações são classificadas de acordo com a cadeia globínica deficiente (CUNNINGHAM, 2008).

Nas talassemias a estrutura primária da hemoglobina, geralmente, é normal, diferenciando-se das hemoglobinas variantes, formadas por uma cadeia de globina estruturalmente anômala. Além da sua importância clínica como o grupo mais comum de doença monogênica na população mundial, as talassemias proporcionam variedade de modelos de ocorrência natural para o estudo da regulação da síntese das hemoglobinas, do seu desenvolvimento genético e relação antropológica. As talassemias do tipo α e β são as mais frequentes e melhor definidas, seguidas das do tipo alfa-beta, delta-beta, delta, e gama-delta-beta. Existe ainda outro grupo, mais raro, caracterizado pela manutenção de hemoglobina fetal em quantidades aumentadas na vida adulta por PHHF, muitas vezes considerada uma forma compensada de delta-beta talassemia (WEATHERALL; CLEGG, 1981; HONIG; ADAMS III, 1986; BONINI-DOMINGOS, 2006).

1.3 Beta talassemia

A beta talassemia é uma hemoglobinopatia que se caracteriza por uma alteração quantitativa da síntese de globinas beta e são classificadas como talassemias beta zero (ou talassemia β^0) quando não há síntese de globinas beta, e talassemias beta mais (ou talassemia β^+) quando há redução na taxa de síntese (WEATHERALL, 2006).

A beta talassemia exhibe acentuada heterogeneidade, quer quando analisada em seu aspecto clínico, bioquímico ou molecular (ZAGO, 1986). A variabilidade clínica e hematológica está associada a fatores genéticos, e é confirmada pela grande quantidade de mutações e alterações gênicas que originam as beta talassemias e cuja classificação pode ser realizada por testes clássicos para a triagem e testes específicos como a análise de DNA (ZAGO, 2005).

A beta talassemia possui padrão de herança autossômico recessivo, entretanto, também existem casos de talassemia dominante relacionados a fenótipos intermediários (WEATHERALL, 2001), sendo necessários dois genes anormais de globina beta para produzir o fenótipo clinicamente detectável (LERMEN *et al.*, 2007). Quando considerada do ponto de vista clínico, a doença pode ser classificada em beta talassemia maior, intermediária e menor (ZAGO, 2005).

A beta talassemia é a forma mais importante das talassemias devido à elevada taxa de morbidade e mortalidade. A Organização Mundial da Saúde calcula que nascem por ano de 20.000 a 40.000 crianças com beta talassemia homozigótica, sendo mais da metade deles na Ásia. Na Europa, as maiores prevalências de heterozigotos β talassêmicos ocorrem na Itália (2-15%), Chipre (18%) e Grécia (8%). Na Península Ibérica a distribuição é heterogênea variando a frequência na população de 0,1 a 2%. Estima-se em mais de 4 milhões o número de heterozigotos no sul da Europa, e por volta de 200.000 em Portugal e Espanha (ZAGO, 2005). Nos países do Oriente Médio a prevalência do gene β talassêmico varia entre 1% e 30% (WEATHERALL, 2001). No Brasil, a beta talassemia menor oscila entre 0,5% e 1,5% (NAOUM; NAOUM, 2004).

Na região de Ribeirão Preto-SP, um estudo realizado por Zago e colaboradores em 1983 avaliando 400 crianças em idade escolar, 602 mães e 606 recém-nascidos, revelou a presença de 0,8% (13 casos) de heterozigotos para beta talassemia. Em estudo de rastreamento para hemoglobinopatias realizado em Campinas-SP e região em 1999 por Ramalho *et al.*, analisando 13.670 indivíduos, demonstraram a presença de 1,3% (178) de

traço beta talassêmico. Já um rastreamento para hemoglobinopatias realizado pelo Laboratório Municipal de Saúde Pública do Recife – PE, analisando 12.173 amostras no período de novembro de 2002 a dezembro de 2004, demonstrou uma frequência de 0,68% de beta talassemia menor (ALMEIDA *et al.*, 2005).

1.3.1 Bases moleculares da beta talassemia

Os genes responsáveis pela síntese de cadeias da β globina e similares estão organizados num agrupamento, localizado no braço curto do cromossomo 11, na posição p13-pter, com tamanho aproximado de 50kb, que contém cinco genes funcionais (5'- ϵ - γ^G - γ^A - ψ β - δ - β -3'), arranjados na sequência 5'-3', na mesma ordem em que são ativados durante as fases do desenvolvimento humano. Com exceção dos pseudogenes, caracterizados por ψ , os demais *loci* apresentam sequências de bases cujos éxons são responsáveis pela produção de cadeias polipeptídicas que recebem o nome do gene que lhe originou. Os pseudogenes possuem sequências homólogas aos genes ativos, mas não se expressam como um *locus* estrutural (FORGET, 1979; LEBO *et al.*, 1979; BARTON *et al.*, 1982; WEATHERALL; WAINSCOAT, 1985; THEIN, 1998).

Os genes, da cadeia tipo beta e tipo alfa, apresentam estruturas semelhantes, onde três regiões codificadoras dos mesmos (os éxons) são interrompidas por outras duas constituídas de sequências que não se expressam em produto protéico (os íntrons = IVS = Intervening Sequence). Nos genes do grupo beta, o primeiro éxon codifica os aminoácidos de 1 a 29 juntamente com as duas primeiras bases do códon 30, o segundo éxon codifica parte do resíduo de 30, juntamente com os aminoácidos 31 ao 104, e o terceiro éxon, os aminoácidos 105 ao 146, enquanto que no grupo da globina alfa, as sequências são interrompidas entre os códons 31 e 32 e códons 99 e 100 (JEFFREYS; FLAVELL, 1977; LAWN *et al.*, 1980, THEIN, 2005)(Figura 3).

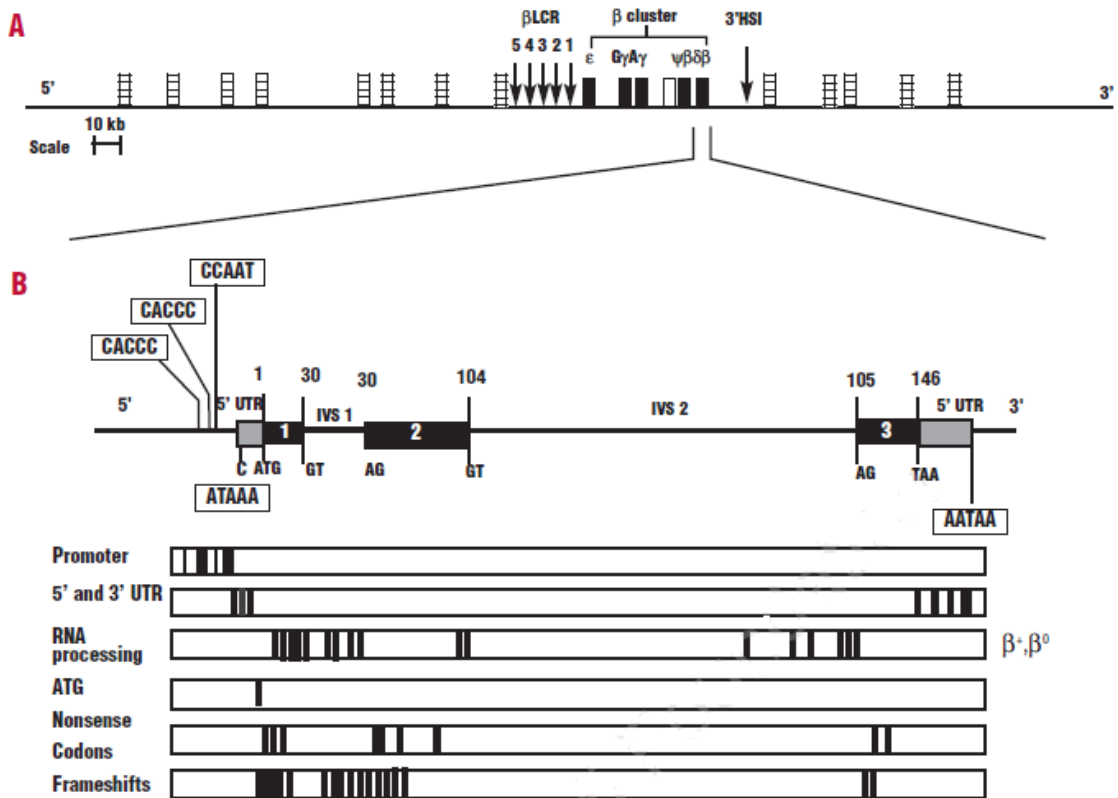


Figura 3. A. O conjunto do gene β globina e as suas regiões flanqueando o cromossomo 11p. O endereço GG, AG, D e genes da globina β são indicados como caixas cinza. Os sítios 5' hipersensibilidade (1 a 5) que compõem o β LCR e os sítios 3' hipersensibilidade (3' HS1) são mostrados como setas verticais. B. Estrutura geral do gene da globina β com os 3 éxons (caixas pretas) e os 2 grupos de intervenientes (IVS 1 e IVS 2). Sequências conservadas são indicadas. As diferentes classes de mutações que causam beta talassemia são apresentadas abaixo dos genes da globina beta.

Fonte: Thein, 2005.

Os genes da globina humana são transcritos nas células eritróides, sendo essa transcrição estabelecida pelas sequências de bases contidas nos éxons e íntrons; sofrem modificações nas extremidades 3' e 5', até ser estabelecida a forma de RNAm funcional. Como parte destas modificações há o processo de *splicing*, que consiste na retirada dos íntrons e a união dos éxons, formação de um capuz metilado na extremidade 5' por adição de ácido guanílico metilado e formação da cauda poli-A, responsável pelo transporte de RNAm do núcleo para o citoplasma, em 3', adicionando-se uma série de ácido adenílicos. O sítio preciso dessas modificações é determinado por sequências de bases específicas. O processo de *splicing* é considerado como fundamental para a formação do RNAm final, que sofrerá modificações por tradução até atingir estado funcional (CHENG, 1980-1981; BUSCH *et al.*, 1982; HONIG; ADAMS III, 1986; WEATHERALL, 1997).

Há vários tipos de mutações nos genes da globina que determinam a redução ou ausência da síntese das cadeias de globina. O efeito da mutação sobre a produção da cadeia globínica depende de seu efeito sobre a quantidade e qualidade de RNAm. Estas mutações podem ter três consequências alternativas: suprimem ou reduzem a transcrição do DNA em RNAm; a transcrição está normal, mas o processamento do RNA inicialmente produzido no núcleo para formar o RNAm maduro não ocorre ou está reduzido; o RNAm é produzido em quantidade normal, mas tem um defeito na região codificante que impede a tradução de uma cadeia globínica normal (ZAGO, 2005).

A beta talassemia pode ser decorrente de mutação em ponto, deleção ou inserção de poucos nucleotídeos, resultando num decréscimo da transcrição, incapacidade de iniciação da tradução, processamento anormal de RNA, erro de leitura, terminação prematura de hemoglobinas instáveis (HATTORI, 1999). Das mais de 200 mutações caracterizadas no gene beta, a maioria representa mutações pontuais em regiões funcionalmente importantes do gene, causadas por uma variedade de mecanismos ou em sequências flanqueadoras do gene (<http://globin.bx.psu.edu/hbvar/>) (Figura 4).

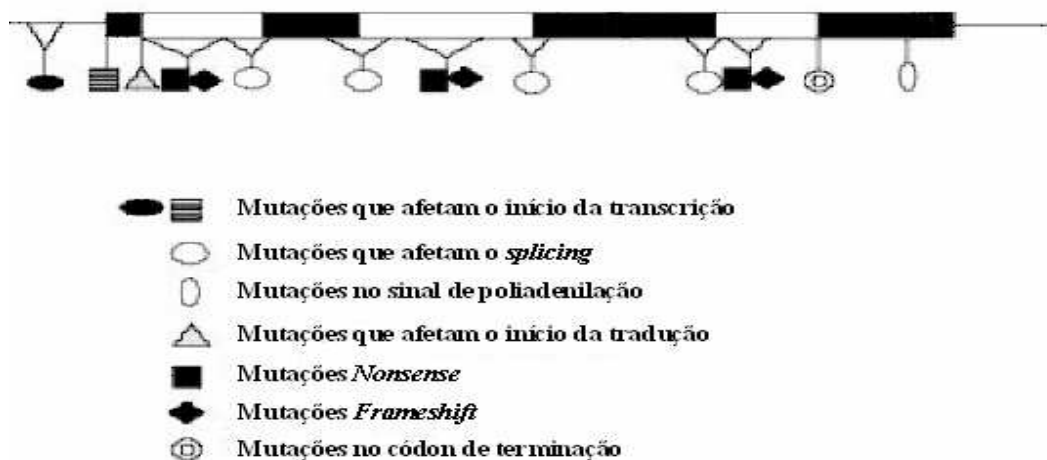


Figura 4: Diferentes mecanismos moleculares que causam talassemia beta.
 Fonte: Adaptado de Cao, 2002

As mutações nas regiões reguladoras (*CAT box* e *TATA box*), que antecedem aos genes, reduzem a eficiência da transcrição do RNAm por diminuírem a ligação desse ácido ribonucleico a fatores transcricionais, originando assim talassemias do tipo β^+ . Esse tipo de mutação leva à substituição de nucleotídeos no “*TATA box*” e nas sequências *CACACC* distal e proximal, todos na região promotora 5’ do gene β . Estão geralmente associadas a fenótipos moderados. Variações étnicas dos fenótipos são observadas, sendo provavelmente

influenciadas pela presença ou ausência de um nucleotídeo na região promotora (KAZAZIAN Jr., 1990; THOMPSON, 1993; ZAGO, 2005).

As mutações no sinal de poliadenilação dificultam a adição da cauda poli A ao RNAm que torna-se mais instável. Esses transcritos alongados de cadeias β são instáveis, porém a maior parte dos transcritos produzidos é normal. Essas mutações geralmente levam a um fenótipo de talassemia β^+ leve (THEIN, 1998; FORGET, 2001).

As mutações que afetam a estabilidade do RNAm podem estar tanto no capuz da extremidade 5', como na região de clivagem do RNAm ou no sinal de poliadenilação AATAA da extremidade 3'. As mudanças no capuz que alteram o primeiro resíduo afetam a função do RNAm, reduzindo a transcrição e retardando o processo de formação do capuz, alterando dessa forma a estabilidade do RNAm. Do mesmo modo, mutações na extremidade 3', reduzem acentuadamente a clivagem do RNAm, produzindo moléculas mais longas e instáveis (KAZAZIAN Jr., 1990; THOMPSON, 1993; ZAGO, 2005).

As mutações que afetam o processamento do RNA talvez sejam as de maior interesse funcional. O RNA inicialmente transcrito contém éxons e íntrons. A perda dos íntrons é essencial para formar um RNA funcional. Mutações nas uniões éxon-íntron (ou próximas a elas) impedem ou dificultam a retirada do íntron, originando talassemia β^0 ou β^+ , respectivamente. De fato, a análise desses genes β talassêmicos tem proporcionado minuciosa reflexão acerca das sequências de RNA requeridas para um *splicing* de RNA específico e eficiente. Mutações que afetam os invariáveis dinucleotídeos GT na extremidade 5' (doadora) e na AG na extremidade 3' (receptora), suprimem o *splicing* normal e produzem talassemia do tipo β^0 , onde nenhum RNAm é encontrado. Ao lado desses invariáveis dinucleotídeos existem sequências que estão bem conservadas e, pode ser reconhecida certa leitura consensual. Mutações que ocorrem nessas sequências reduzem a eficácia do *splicing* em vários graus e produzem fenótipos de talassemia que variam de leves a graves (TREISMAN; ORKIN; MANIATIS, 1983; THEIN, 1998; FORGET, 2001; ZAGO, 2005).

Incluem-se ainda, nos defeitos que afetam o processamento do RNA, as mutações que criam um sítio adicional de *splicing*. Cada molécula de RNA poderá então ser processada pela via normal, empregando os sítios normais de *splicing* que retiram o íntron e formam um RNAm funcional ou alternativamente pela via anômala, onde parte do RNA será processada empregando o novo sítio de *splicing*, resultando um RNAm anômalo (RNAm não funcional). Estas mutações são causadoras de talassemia β^+ , e a quantidade de cadeias β produzida dependerá da proporção de moléculas de RNAm processadas pela via normal (FORGET, 2001; ZAGO, 2005).

Aproximadamente a metade dos alelos beta talassêmicos produz talassemias β^0 . Muitos são erros de leitura, ou seja, alteração na fase de leitura provocada pela inserção ou deleção de um único nucleotídeo na região codificante do gene beta. Essas mutações modificam a leitura normal e interferem na tradução do RNAm pela criação de um códon de terminação prematura. Outras são mutações chamadas de *nonsense*, isto é, substituição de bases que introduzem, também, um códon de terminação prematura. Cadeias globínicas truncadas podem ser produzidas como resultado de tais mutações, mas elas não são usualmente detectadas, presumivelmente porque são muito instáveis e rapidamente degradadas, originando o fenótipo de talassemia β^0 (THEIN, 1998; FORGET, 2001).

Essas alterações genéticas responsáveis pela deficiência da produção das cadeias beta afetam um pequeno número de pares de bases e são determinadas por mecanismos acima descritos, sendo um número, relativamente pequeno, de alelos específicos responsável por grande parte das mutações beta talassêmicas, de acordo com as populações analisadas, identificando-se principalmente mutações como β^0 CD 39, β^+ IVS-I-110, β^+ IVS-I-6, β^0 IVS-I-1, dentre outras (NAOUM, 1997).

Essas quatro mutações acima listadas são de origem mediterrânea. A mutação no códon 39 é um tipo de mutação sem sentido, que forma códons de terminação na região codificadora interrompendo a tradução e impedindo a produção de cadeias β , levando ao genótipo β^0 . A mutação IVS-I-110 é um exemplo de defeito que afeta o processamento do RNA criando sítio adicional de *splicing*. Nesse tipo de mutação ocorre a substituição de A→G no nucleotídeo 110 do íntron 1, que produz uma forma grave de talassemia β^+ , pois apenas 10-20% do RNAm são processados pela via normal. Essa mutação é uma das maiores causas de talassemia β^+ no Mediterrâneo. A mutação IVS-I-1 resultante da troca de G→A no primeiro nucleotídeo do primeiro íntron que impede o processamento do RNA para retirar o íntron, impedindo a síntese de cadeias β , ou seja, levando a talassemia β^0 (FORGET, 2001; THEIN, 2005; ZAGO, 2005).

A mutação no nucleotídeo 6 do íntron I (IVS-I-6 T→C) produz talassemia β^+ leve (TREISMAN; ORKIN; MANIATIS, 1983). Esta também é exemplo de mutação que afeta o processamento do RNA por redução da eficácia do *splicing*. É geralmente citada como a forma portuguesa de talassemia (TAMAGNINI *et al.*, 1983) e faz parte da maioria das mutações leves encontradas em talassêmicos do Mediterrâneo (THEIN, 1998). Os indivíduos homocigotos IVS-I-6/IVS-I-6, em geral têm quadro clínico, ou expressão fenotípica, compatível com a talassemia intermediária (COSTA; TAVELA; ZAGO, 1991).

1.3.2 Mutações

As mutações na beta talassemia são regionalmente específicas, dividindo-se em quatro grupos de países: do Mediterrâneo, da Índia, do Sudeste asiático e da África. Cada país em seu grupo tem um espectro de hemoglobinas anormais e mutações talassêmicas, entretanto as mutações encontradas variam de acordo com a região. Essas mutações são dispersas através da imigração. A distribuição e frequência de mutações das hemoglobinopatias, especialmente para a beta talassemia, já foi caracterizada para a maioria dos países (CABEDA *et al.*, 1999; HENDERSON *et al.*, 2009).

Cada grupo étnico tem como próprio um pequeno número de alelos específicos. Estes são responsáveis por aproximadamente 90% das mutações beta talassêmicas, ou seja, nas populações da região mediterrânea: códon sem sentido 39 (C → T), IVS-I-110 (G → A), IVS-I-6 (T → C), IVS-I-1 (G → A) e a IVS-II-745 (C → G). Dois destes defeitos moleculares são responsáveis por aproximadamente 60% das mutações, a β^0 e a β^+ que predominam respectivamente a leste e a oeste da bacia do Mediterrâneo. Na população da Índia e do Paquistão as mutações mais frequentes são a IVS-I-5 (G → G), deleção de 619 pares de bases, *frameshift* (erros de leitura) 8-9, IVS-I-1 (G → T). Na China e no sudeste da Ásia as mutações que mais acometem a população são IVS-II-654 (C → T), códon sem sentido 17 (A → T) e -28 (A → G); entre os negros americanos: -29 (A → G), -88 (G → T) e códon 24 (T → A). O Norte da África (Argélia e Tunísia) se caracterizam por apresentar mutações típicas da região do Mediterrâneo, assim como outras mutações provenientes de diversos continentes conferindo uma heterogeneidade molecular da região (IVS-I-1 G → C, IVS-I-2 T → C, IVS-I-5 G → A e IVS-I-843 C → A) (WEATHERALL, 2001, 2006; CAPPELLINI *et al.*, 2008) (Figura 5).

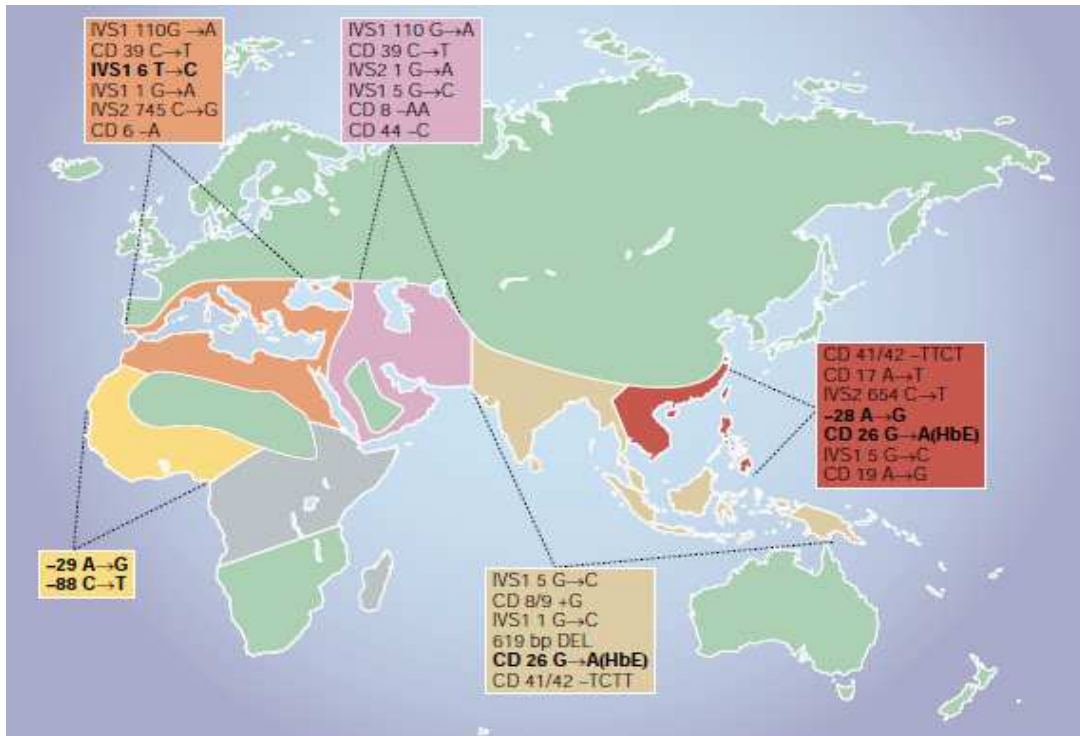


Figura 5- Distribuição global das mutações na beta talassemia. As mutações comuns são exibidas em negrito.

Fonte: Adaptado de Weatherall, 2001.

Em 2003, Old demonstrou que as mutações mais prevalentes no Mediterrâneo também variam em frequência entre os países do próprio continente. Na Itália e Portugal, 40,1% e 19% das mutações, respectivamente, são CD39, já na Grécia e Turquia predomina a mutação IVS-I-110 (Quadro 2).

Quadro 2. Distribuição das mutações beta talassemia em alguns países do Mediterrâneo e de outros países

Mutação	Mediterrâneo				Ásia		
	Itália	Grécia	Turquia	Portugal ¹	Índia	Paquistão	China
CD 39	40.1%	17.4%	3.5%	19%	-	-	-
IVS-I-1	4.3%	13.6%	2.5%	16%	-	-	-
IVS-I-6	16.3%	7.4%	17.4%	8%	-	-	-
IVS-I-110	29.3%	43.7%	41.9%	10%	-	-	-
IVS-I-5	-	-	-	-	48.5%	26.4%	2.5%

Fonte: Adaptado de Old, 2003; 1- Cabeda *et al.*, 1999.

Para Shafer, Hine e Levy (1987), além de gregos e italianos, a beta talassemia também afeta comumente indivíduos de nacionalidade síria ou armênia, embora um grande número de casos tenha sido registrado em outros países da Europa ou do Extremo Oriente, bem como em negros da África e dos Estados Unidos.

No Brasil, tanto alfa quanto a beta talassemia é resultante da grande miscigenação da população brasileira com a imigração ocorrida no final do século XIX e início do século XX, em que o Brasil recebeu cerca de cinco milhões de imigrantes europeus e asiáticos, principalmente representados pelos italianos que se estabeleceram no Sul e no Sudeste do país (ZAGO *et al.*, 1983; BONINI-DOMINGOS *et al.*, 2000; BONINI-DOMINGOS, 2004).

As mutações beta talassêmicas encontradas no sul e sudeste brasileiro, representado por Porto Alegre, Ribeirão Preto e Campinas, são a IVS-I-1, IVS-I-6, IVS-I-110 e códon 39, na qual esta última é a mutação mais prevalente (REICHERT, 2008). Entretanto, no nordeste brasileiro, representado por Pernambuco, foi encontrada a mutação IVS-I-5 além das citadas acima, sendo a IVS-I-6 a mais frequente (ARAÚJO *et al.*, 2003).

1.3.3 Fisiopatologia

O processo fisiopatológico da beta talassemia está relacionado com o desequilíbrio entre as sínteses de globina alfa e beta. Esse desequilíbrio é causado por mutações que afetam os *locus* da β globina de forma heterogênea. Com a síntese de globina beta afetada, por diminuição parcial (β^+) ou bloqueio total (β^0), a relação não- α/α é inferior a 1,0. Nas talassemias beta homozigóticas a relação não- α/α é cerca de 0,3, enquanto que na beta talassemia heterozigótica é de 0,5 (FORGET, 2001; WEATHERALL, 2001).

As cadeias alfas excedentes na beta talassemia precipitam, podendo formar agregados nos eritroblastos, promovendo lesões na membrana, comprometer o ciclo mitótico e o metabolismo celular induzindo a apoptose. Na medula óssea, observam-se uma sequência de fenômenos que se iniciam pela peroxidação dos lipídeos da membrana e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), os radicais oxidantes ou radicais livres. A célula com pouca hemoglobinizacão é sensível a esse tipo de agressão tóxico-oxidante, pois a membrana comprometida permite a perda de potássio e adenosina-tri-fosfato (ATP), tornando a célula rígida, e como consequência dificulta sua saída da medula óssea para o sangue periférico (FORGET, 2001; WEATHERALL, 2001; RUND; RACHMILEWITZ, 2005).

Por outro lado, as células que têm maior hemoglobinizacão, apresentam-se com menor grau de lesões e, portanto, maior período de vida. Ainda em relação às células eritroblásticas, a precipitaçao de globinas alfa causa o bloqueio da síntese de DNA com consequente interrupçao da síntese de globinas. O somatório da precipitaçao de globina alfa, rigidez celular e lesao do DNA levam à destruiçao da maior parte dos eritroblastos na medula óssea antes de completar o desenvolvimento, fenômeno denominado eritropoese ineficaz que é responsável pelo quadro de anemia e pelo aumento da absorçao do ferro (FORGET, 2001; WEATHERALL, 2001; RUND; RACHMILEWITZ, 2005). É importante enfatizar que, quanto menor for o desequilíbrio da síntese das globinas, menor será a taxa de globinas alfa livres que precipitam no interior da hemácia e, conseqüentemente, menor será a taxa de eritropoese ineficaz, o grau de anemia e suas complicaçoes clínicas (MAGGIO, 2000).

Na eritropoese normal, os mecanismos de apoptose são necessários para a maturaçao eritróide e parecem desempenhar papel regulador. A medula óssea dos pacientes com talassemia contém cinco a seis vezes mais o número de precursores eritróides em relaçao à medula óssea de indivíduos saudáveis, porém, também contém 15 vezes mais o número de células em apoptose, principalmente nos estágios de eritroblastos policromatófilos e ortocromáticos. A apoptose acelerada é uma das principais causas de eritropoese ineficaz e nesse caso, em decorrência do excesso de cadeias alfas depositadas nos precursores eritroblásticos. Embora o mecanismo exato não seja totalmente conhecido, uma via de sinalizaçao mediada por receptor parece estar envolvida com interaçoes Fas-Fas ligante. O principal regulador da eritropoese basal é a eritropoietina (EPO). A interaçao de EPO com o seu receptor induz, através Jak2 e Stat5, múltiplas vias de sinalizaçoes destinadas a prevenir a apoptose e regular a proliferaçao eritróide (RUND; RACHMILEWITZ, 2005; LIBANI, *et al.*, 2008; RIVELLA, 2009).

Quando os eritrócitos contendo os corpos de inclusões compostos por globinas α atingem o sangue periférico, sua rigidez, associada às lesões na membrana eritrocitária, causadas à medida que elas atravessam a micro circulaçao, contribui para o sequestro dessas células durante a circulaçao nos sinusóides esplênicos, este fenômeno é denominado de hemocaterese. Este fenômeno desencadeia um aumento da concentraçao de bilirrubina indireta e esplenomegalia. A esplenomegalia pode ser decorrente da elevada hemocaterese e presençao de hematopoese extramedular, podendo evoluir ainda, para o hiperesplenismo pelo aumento da funçao do baço (ZAGO, 2005).

Várias anormalidades de estrutura e funçao da membrana eritrocitária têm sido descritas como o aumento de fosfolipídios e de colesterol, do fluxo de cátions e da

permeabilidade ao cálcio. As membranas são mais rígidas e mais instáveis, provavelmente em razão da ligação das cadeias alfa oxidadas a proteínas. As cadeias de globina precipitadas interagem com as proteínas anquirina e espectrina do citoesqueleto da membrana, alterando suas propriedades e provocando alterações mecânicas. A oxidação das cadeias de globina leva à formação de hemicromos que se associam com a proteína 3 da membrana, formando antígenos externos, suscetíveis à ação de anticorpos específicos e à retirada da circulação. As alterações das proteínas, a união de cadeias de hemoglobina, a peroxidação de lipídeos e a polimerização de componentes da membrana, por sua vez, contribuem para diminuir a deformidade da membrana, alterar o fluxo de cátions e provocar irregularidades no eritrócito (RUND, 2005; ZAGO, 2005; URBINATI; MADIGAN; MALIK, 2006).

A viscosidade citoplasmática das hemácias na beta talassemia está também aumentada, como consequência da desidratação celular, um processo que envolve os sistemas controladores dos efluxos de íons e água, anormalmente ativados (CATLIN, 2003; DHALIWAL; CORNETT; TIERNEY Jr., 2004; DATTA *et al.*, 2006; URBINATI; MADIGAN; MALIK, 2006; DE FRANCESCHI *et al.*, 2007). Diante da hemólise e da ineficiência da eritropoese, a medula óssea faz acelerar a produção de eritrócitos, porém insuficiente para evitar a anemia grave (SONATI; COSTA, 2008).

A eritropoese ineficaz e a inadequada supressão de hepcidina (proteína reguladora da absorção intestinal de ferro) estimulam a absorção intestinal de ferro levando à sobrecarga (hemocromatose). O ferro, altamente oxidativo, causa a formação de radicais livres tóxicos, com peroxidação lipídica das membranas, seguida de lise. A saturação da transferrina resulta em níveis aumentados de ferro livre no plasma, afetando vários órgãos, particularmente o coração (ZAGO, 2005; URBINATI; MADIGAN; MALIK, 2006; WEIZER-STERN *et al.*, 2006; TANNO, 2007; TOUMBA *et al.*, 2007; AESSOPOS, 2007). As consequências do excesso do ferro são as causas de óbitos mais frequentes nos talassêmicos a partir da segunda década de vida (ZAGO, 2005).

Entre as causas das complicações cardíacas estão: anemia, sobrecarga de ferro, doença pulmonar, miocardite e pericardite. Vários estudos com cardiomiócitos em cultura têm revelado que a toxicidade causada pelo ferro modifica profundamente a contratilidade e o comportamento eletrofisiológico destas células, e que essas alterações estão provavelmente associadas à elevada peroxidação dos lipídeos da membrana celular (COHEN, 2004; AESSOPOS, 2007).

Eventos tromboembólicos são frequentes na beta talassemia nas formas intermediária e maior, e podem estar associados ao aumento da exposição da fosfatidilserina na membrana eritrocitária, pela ativação das plaquetas, por uma maior aderência das hemácias ao endotélio, por uma expressão aumentada de moléculas de adesão nas células endoteliais e por ativação dos monócitos. Ainda, os níveis das proteínas anticoagulantes C, S e da antitrombina parecem estar reduzidos nesses casos (PANIGRAHI *et al.*, 2006; WEATHERALL, 2006; ATAGA; CAPPELLINI; RACHMILEWITZ, 2007).

A principal causa das anormalidades endócrinas parece ser o dano celular resultante do excesso de ferro, embora a hipóxia dos tecidos também possa contribuir. A pituitária, as gônadas, o pâncreas, e as glândulas tireóide, paratireóides e adrenais estão afetados; diabetes, hipogonadismo, osteopenia e osteoporose são comuns. As fraturas frequentes, em casos inadequadamente tratados, devem-se a expansão medular para compensação da eritropoese ineficaz, disfunção endócrina e complicações relativas à própria terapia contra a sobrecarga de ferro (ZAGO, 2005; TOUMBA *et al.*, 2007). As lesões ósseas determinam a presença de deformidades do crânio, maxilar e face, baixa estatura e a presença de massas extra-ósseas, ou metaplasias mielóides, com formações tumorais no mediastino e retroperitônio ou acentuada esplenomegalia e hepatomegalia (ZAGO, 2005, WEATHERALL, 2006).

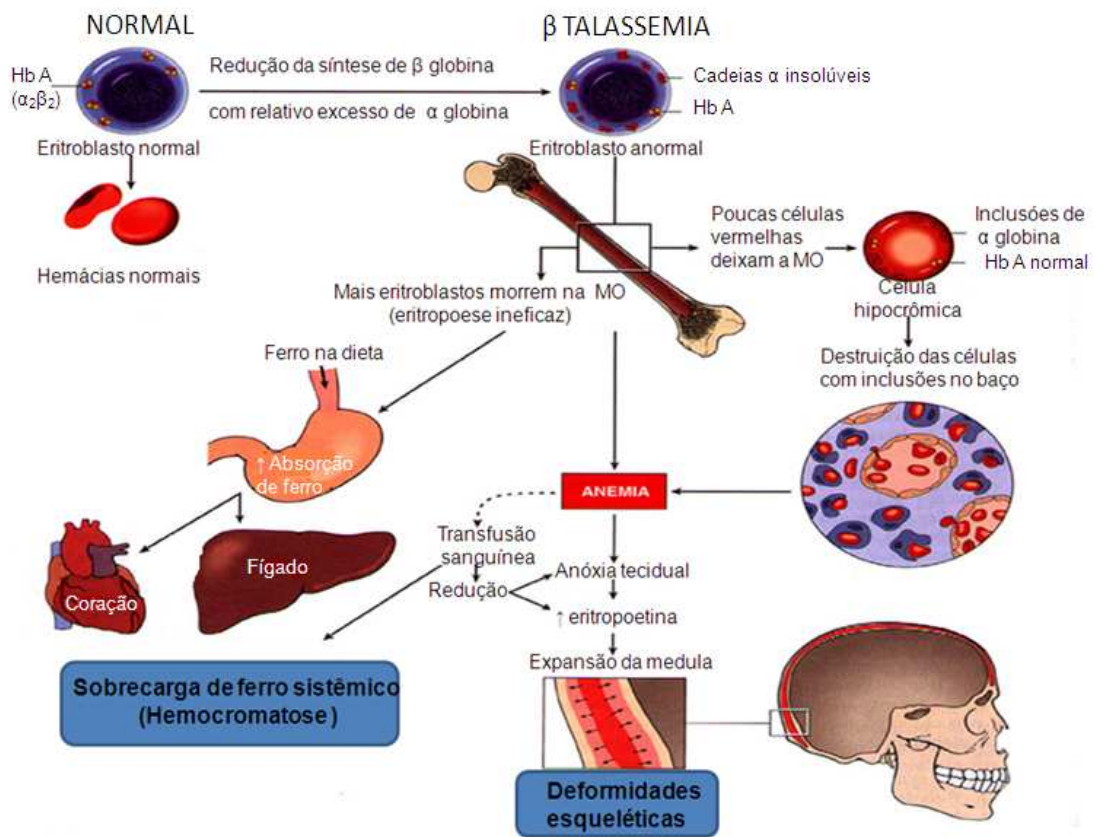


Figura 6- Representação esquemática da fisiopatologia da beta talassemia
 Fonte: Adaptado do site
<http://genetica.ufcspa.edu.br/seminarios%20apresentacoes/Btalassemia.ppt>

1.3.4 Formas clínicas

A beta talassemia apresenta heterogeneidade molecular e expressão fenotípica variável, podendo ser assintomática ou resultar em uma anemia que pode variar de leve a intensa (HUISMAN *et al.*, 2001; SONATI; COSTA, 2008). O diagnóstico da beta talassemia a partir de dados clínicos, laboratoriais e moleculares, é embasado fundamentalmente na gravidade da anemia que se apresenta microcítica e hipocrômica nas três formas: maior, intermediária e menor (CAO *et al.*, 1997).

O primeiro relato científico da talassemia beta homozigota foi realizado por um pediatra americano, o Dr. Thomas B. Cooley, que juntamente com sua colega Pearl Lee descreveu, em 1925, os achados hematológicos e clínicos em quatro crianças que apresentavam anemia grave com aumento do baço e deformidades dos ossos da face e do

crânio. Destacaram um fato importante: as crianças tinham origem ancestral da região do mar Mediterrâneo, por serem de descendência italiana e grega. A partir desse relato, essa síndrome foi denominada por anemia de Cooley & Lee, mas constantemente referida apenas como anemia de Cooley. Alguns anos depois, devido à alta prevalência de relatos similares, principalmente na Itália e na Grécia, e também no Líbano, Tunísia, Argélia entre outros, esses casos de anemia grave passaram a ser denominados de Anemia do Mediterrâneo. Posteriormente, durante o Congresso Internacional de Hematologia em 1940, um grupo de cientistas optou pelo termo *talassemia major*, onde, em grego, *thalassa* significa mar, e *aima*, doença do sangue. A adjetivação da gravidade inicialmente foi caracterizada pela palavra *major*, que significa maior. Posteriormente, com o aprofundamento dos estudos genéticos, passou-se a conhecer melhor as formas de transmissões hereditárias e os defeitos dos genes, e a forma grave foi denominada de talassemia beta homocigota; a talassemia *minor* ou menor, de heterocigota; e a talassemia intermédia foi definida por uma classificação muito mais clínica do que genética ou laboratorial (WEATHERALL, 2006).

- Talassemia beta maior

A beta talassemia homocigota é o resultado do estado homocigoto tanto do tipo β^+ quanto do β^0 ou, em casos de duplo componente heterocigoto β^+/β^0 . A ausência ou deficiência acentuada na produção de cadeias beta causa anemia grave (Hb < 6,0g/dL) devido à eritropoese ineficaz e ao sequestro das hemácias no baço. A ausência completa (ou quase completa de cadeia beta) permite a formação de uma quantidade expressiva de complexos de cadeia alfa que irão provocar destruição celular. Como até os três a seis meses de idade a hemoglobina predominante é a Hb F, não há necessidade de cadeia beta e não há excesso de cadeias alfa, uma vez que as mesmas se ligam às cadeias gama para formar a HbF. A partir dessa faixa etária, a doença se instala com anemia grave (Hb entre 3-5g/dL) e icterícia. O ritmo acelerado de destruição de células eritróides (tanto na medula quanto na periferia) estimula a proliferação e maturação dos eritroblastos (hiperplasia eritróide). Como consequência, há uma grande expansão da medula óssea levando às clássicas deformidades ósseas talassêmicas (WEATHERALL; CLEGG, 1981; MAGGIO, 2000).

Enquanto as reservas metabólicas são utilizadas para expansão do *eritron*, outras funções, como crescimento, desenvolvimento e resposta imunológica ficam prejudicadas. Por isso, baixa estatura torna-se uma regra, bem como disfunção endócrina, inanição e

susceptibilidades a infecções. Pela hemólise crônica estão sujeitas a litíase biliar e a úlceras maleolares. A hepatoesplenomegalia é um achado clássico e se deve à hemólise crônica e a eritropoese extramedular (WEATHERALL; CLEGG, 1981; MAGGIO, 2000).

O padrão de hemoglobinas nos pacientes com beta talassemia homozigota é variável, caracterizando-se pelo aumento de Hb F, com concentrações que variam de 20 a 90%. A Hb A₂ pode estar normal ou elevada, e a Hb A aparece somente nos casos de deficiência parcial da síntese de cadeias beta. A maioria dos pacientes necessita de transfusões regulares, a cada 3 ou 4 semanas. As transfusões repetidas durante longos anos levam à sobrecarga de ferro no organismo causando hemossiderose transfusional, além do acúmulo de ferro por aumento da absorção intestinal (hemocromatose eritropoética). O ferro se acumula em diversos órgãos e tecidos, provocando morte de células e disfunção orgânica, por isso o regime de quelação deve ser iniciado o mais precocemente possível, para evitar deformidades ósseas e danos ao pâncreas, fígado, miocárdio e outros órgãos. Este processo é preconizado para iniciar após a décima sessão de transfusão (CAPPELLINI *et al.*, 2008).

Na ausência de diagnóstico e tratamento, a maioria dos pacientes com talassemia grave morre antes dos cinco anos de idade. Com o seguimento das recomendações, as complicações mencionadas são evitáveis ou tratáveis. O tratamento preconizado para a talassemia maior envolve transfusões regulares de sangue, usualmente administradas cada duas a cinco semanas, a fim de manter o nível de hemoglobina pré-transfusão acima de 9-10,5 g/dl. Esse regime de transfusão provoca o crescimento normal, permite atividades físicas normais, suprime adequadamente a atividade da medula óssea, e minimiza o acúmulo de ferro transfusional (CAPPELLINI *et al.*, 2008).

- Talassemia beta intermediária

Na beta talassemia intermediária são encontrados fenótipos clínicos intermediários entre o traço talassêmico e a talassemia maior. As formas clínicas dessa beta talassemia são aquelas resultantes de diferentes interações genéticas, cujos portadores apresentam quadro clínico mais favorável do que os pacientes com talassemia beta maior (BANK, 2005; ZAGO, 2005; WEATHERALL, 2006; HUISMAN *et al.*, 2001; SONATI; COSTA, 2008)

Os indivíduos apresentam anemia crônica moderada com níveis de hemoglobina de 6-9 g/dL e não dependem de transfusões regulares. Dentre os achados clínicos, as deformidades ósseas faciais, as úlceras de perna, a icterícia intermitente, os episódios de litíase biliar recorrente e a esplenomegalia progressiva, são os mais característicos. Com o avanço da idade, os pacientes podem desenvolver complicações em razão da expansão medular, incluindo anormalidades ósseas, retardo do crescimento, infertilidade, sobrecarga de ferro tecidual devido ao aumento da absorção gastrointestinal de ferro resultante da anemia e hipercoagulabilidade. As complicações trombóticas são mais frequentes nesta classificação clínica do que em pacientes com beta talassemia maior regularmente transfundido. Alguns pacientes desenvolvem hipertensão pulmonar grave similar àquela que ocorre em outras anemias hemolíticas crônicas. A osteoporose é também uma importante complicação que pode ocorrer (BANK, 2005; ZAGO, 2005; WEATHERALL, 2006; SONATI; COSTA, 2008).

O fenótipo da beta talassemia intermediária pode ser afetado por vários fatores. Dentre eles inclui-se a interação de um gene β talassêmico leve com um que geralmente causa β talassemia grave, combinações de genótipos β^+ e β^0 e, também a presença de mutações no gene α . Por exemplo, em pacientes heterozigotos compostos (β^+ e β^0), a clínica pode cursar desde formas leves até graves. Esta modificação fenotípica ocorre quando a expressão de um gene altera a expressão do outro gene (AESSOPOS; BERDOUKAS; TSIRONI, 2007). Entretanto a forma mais prevalente de beta talassemia intermediária se deve a lesões do tipo β^+ (β^+/ β^+), que se caracterizam por uma discreta redução na síntese de globina beta, cujo diagnóstico laboratorial somente é feito por biologia molecular. As mutações -101 (C→T), -87 (C→T), -88 (C→T), -29 (A→G) e a IVS-I-6 (T→C) estão associadas com quadros de beta talassemia intermediária. Por meio de estudos moleculares, foram realizadas várias tentativas de relacionar manifestações clínicas com mutações e outros arranjos moleculares que pudessem de alguma forma, traduzir-se na expressão do fenótipo (HO *et al*, 1998; FORGET, 2001; CAPPELLINI *et al.*, 2008).

A distinção entre talassemia beta maior e intermediária é fundamental na prática clínica, pois define o tipo de tratamento. No entanto, nem sempre é fácil, uma vez que o quadro clínico pode ser resultante de grande número de combinações moleculares e de interações entre diferentes alterações da hemoglobinas, como por exemplo a combinação com hemoglobinas variantes (WEATHERALL, 2006; CAPPELLINI *et al.*, 2008).

- Talassemia beta menor

A beta talassemia menor, também denominada traço talassêmico, é caracterizada pela heterozigose das formas β^0 ou β^+ . Esse estado heterozigoto é determinado geneticamente pela herança de um único componente alterado. Nas formas β^0 e β^+ , a diminuição da taxa de síntese da globina β é reduzida, mas o suficiente para causar discreto grau de anemia microcítica e hipocrômica. São de difícil distinção por exames laboratoriais de rotina, entretanto, com a utilização de técnicas de síntese de cadeias ou de biologia molecular com sondas específicas de DNA, podem-se diferenciar esses heterozigotos (BANK, 2005; HUISMAN *et al.*, 2001; SONATI; COSTA, 2008).

Embora o defeito possa ser detectado por exames laboratoriais específicos, muitas vezes, a talassemia é erroneamente diagnosticada e os pacientes são tratados inadequadamente, como se apresentassem anemia por deficiência de ferro. Laboratorialmente, as formas de talassemia β^0 ou β^+ caracterizam-se pelo aumento de Hb A₂ cuja concentração varia de 3,5 a 7%, alterações morfológicas dos eritrócitos identificados especialmente por microcitose e hipocromia com presença de esquizócitos, dacriócitos e pontilhados basófilos, resistência osmótica aumentada na solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,36%, diminuição da hemoglobina corpuscular média (HCM) com valores entre 20 e 22 pg e do volume corpuscular médio (VCM) com valores entre 50 e 70 fL. A concentração da Hb é em torno de 9 a 11 g/dL. O nível de Hb F pode estar elevado em cerca de cinquenta por cento dos casos, geralmente de 1 a 3% e raramente mais que 5% (ZAGO, 2005; WEATHERALL, 2006).

Os indivíduos com beta talassemia menor são geralmente assintomáticos, e habitualmente não necessitam de tratamento, entretanto os portadores podem apresentar anemia discreta. As manifestações clínicas, quando presentes, variam entre os diferentes grupos raciais, tais como astenia, cansaço e esplenomegalia (BANK, 2005; ZAGO, 2005; HUISMAN *et al.*, 2001; SONATI; COSTA, 2008).

De modo geral, os alelos da talassemia β^+ leve estão associados com espectro variado de mutações em heterozigotos, e resultam em transtornos de gravidade intermediária em homozigotos. A gravidade dos diferentes alelos da beta talassemia se reflete em seus efeitos fenotípicos em heterozigotos, no grau de microcitose e hipocromia (como indicado pelo VCM e HCM) (THEIN, 2005). Estudos demonstram que as mutações IVS-I-6 e IVS-I-110 estão associadas ao fenótipo β^+ , já as mutações IVS-I-1 e CD 39 estão relacionados ao fenótipo β^0 (NAOUM, 1997; THEIN, 2005).

Assim, a beta talassemia apresenta uma complexidade genética, sendo produto de interação de múltiplos fatores genéticos e ambientais, todos contribuindo para a sua ampla diversidade clínica. Nesse contexto, o estudo visa caracterizar o perfil clínico, hematológico e molecular nos indivíduos adultos portadores de beta talassemia, além de promover um estudo de associação genética, podendo ajudar na identificação de vias fisiopatológicas susceptíveis de modulação, oferecendo novas perspectivas terapêuticas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil clínico, hematológico e molecular dos indivíduos adultos portadores de beta talassemia do Hospital Universitário Walter Canídeo (HUWC), em acompanhamento no ambulatório do Serviço de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil demográfico: etnia, idade, sexo, ocupação e procedência dos indivíduos portadores de beta talassemia, ao diagnóstico;
- Avaliar o perfil hematológico e molecular nos portadores de beta talassemia menor e intermediária, ao diagnóstico;
- Relacionar as variáveis (hematimetria, Hb, Ht, VCM, HCM, CHCM, níveis de Hb A₂ e Hb F, contagem de leucócitos e plaquetas, ferritina, ferro sérico, CTLFe, CLLFe e IST) ao diagnóstico, com as mutações;
- Associar as manifestações clínicas com as mutações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Trata-se de um estudo de corte transversal realizado em amostra de 22 pacientes adultos, do Hospital Universitário Walter Canídeo (HEMOCE/HUWC), com diagnóstico clínico e laboratorial de beta talassemia, com idade variando de 18 a 68 anos, em acompanhamento ambulatorial no serviço de referência, de Hematologia e Hemoterapia, do estado do Ceará - HEMOCE, de ambos os sexos, no período de fevereiro de 2008 a setembro de 2009. Os critérios de inclusão foram: adultos com diagnóstico de beta talassemia por meio do hemograma, eletroforese de hemoglobina, dosagem de Hb A₂ e Hb F e do perfil do ferro. Foram excluídos os indivíduos adultos portadores de beta talassemia que receberam transfusão sanguínea nos últimos três meses da coleta ou que se recusaram participar da pesquisa.

No momento anterior à coleta das amostras de sangue foram fornecidas todas as informações sobre os objetivos da pesquisa a cada indivíduo e, aos que concordaram na participação do estudo, foi obtida a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO). Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos dos prontuários dos pacientes e registrados em uma ficha clínica (APÊNDICE).

O projeto que resultou no presente trabalho está em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, e com o parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sob protocolo de número 114.12.07.

3.2 Metodologia

O delineamento do estudo está representado na figura abaixo.

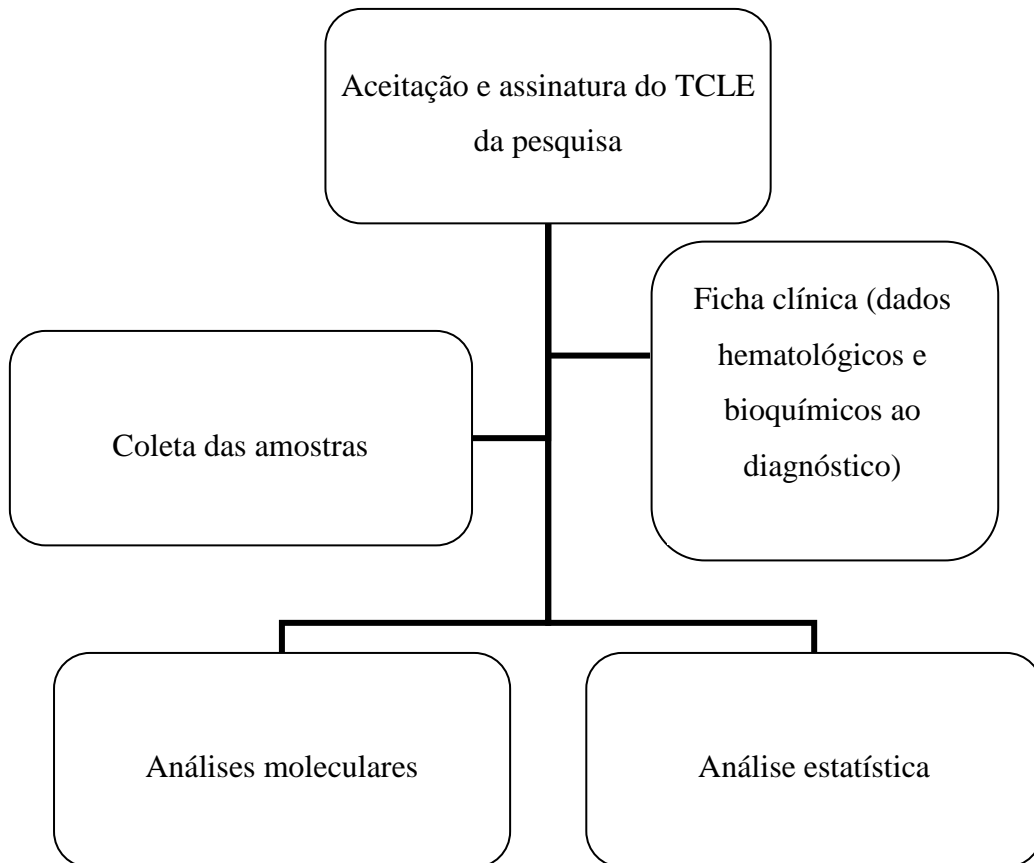


Figura 7- Representação esquemática do delineamento do estudo.

3.2.1 Coleta das amostras

Foram coletados 5 mL de sangue venoso em um tubo de coleta a vácuo, contendo o anticoagulante EDTA (etileno-diamino-tetracético) para extração do DNA genômico e realização das análises moleculares.

As amostras de sangue coletadas foram encaminhadas para o Laboratório de Hemoglobinopatias da Faculdade de Farmácia da UFC; Laboratório de Genética Molecular (LABGEM) do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC e para o Laboratório de Hemoglobinas e Genética de Doenças Hematológicas (LHGDH) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) em São José do Rio Preto-SP, para a realização das análises moleculares.

3.2.2 Dados hematológicos e bioquímicos

Foram coletados dos prontuários dos pacientes os dados hematológicos ao diagnóstico: hemograma, perfil da eletroforese de hemoglobina, níveis de Hb A₂ e de Hb F e; os dados bioquímicos: capacidade total de ligação do ferro (CTLFe), capacidade latente de ligação do ferro (CLLFe), ferro sérico (Fe), ferritina e índice de saturação da transferrina (IST). Os referidos exames foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Walter Cantídeo. Os valores de referência dos parâmetros analisados se encontram discriminados no anexo 2.

As amostras de sangue periférico foram analisadas pelo sistema automático do aparelho *CellDyn*® 3700 para realização dos hemogramas e confeccionadas distensões sanguíneas, coradas pelo método May-Grünwald-Giemsa. Para as determinações bioquímicas: dosagens séricas de ferro (Colorimétrico enzimático) (SIEDEL *et al*, 1984) e ferritina (FORMAN; PARKER, 1980), por Eletroquimioluminescência, capacidade total e latente de ligação do ferro (Goodwin modificado), índice de saturação de transferrina e transferrina por imunoturbidimetria (KREUTZER, 1976) foi utilizado o equipamento analisador bioquímico HITACHI Modular P800.

3.2.3 Determinação dos níveis de Hb F e Hb A₂

A dosagem de Hb F foi realizada pelo método da desnaturação alcalina (BETKE; MARTI; SCHLICHT, 1959). A Hb F é mais resistente à desnaturação por soluções fortemente alcalinas do que outros tipos de hemoglobinas. O teste é realizado adicionando-se uma determinada quantidade de solução alcalina em uma concentração conhecida de hemolisado preparado de eritrócitos lavados e tratados com água e clorofórmio. Após um tempo específico, a desnaturação é bloqueada por adição de sulfato de amônio saturado, ou parcialmente saturado. O sulfato de amônio diminui o pH e precipita a hemoglobina saturada. Após a filtração, a quantidade de hemoglobina inalterada é avaliada e expressa como hemoglobina álcali-resistente (ou Hb Fetal) em valores percentuais (LEWIS; BAIN, 2006).

A dosagem de Hb A₂ foi realizada pela eletroforese quantitativa em acetato de celulose, pH 8,5 (MARENGO-ROWE, 1965). A técnica é utilizada para qualificação e quantificação de hemoglobinas normais e anormais. As diferentes mobilidades eletroforéticas das hemoglobinas anormais são originadas por alteração de carga elétrica, causada por substituições de aminoácidos diferentes nas cadeias formadoras das moléculas. As hemoglobinas anormais que se originam de mutações onde não ocorrem mudanças de carga elétrica, migram na posição de Hb A. Nestes casos, para a caracterização dessas hemoglobinas, usam-se outros processos eletroforéticos, portanto a eletroforese em pH alcalino é utilizada como teste de triagem para hemoglobinas variantes (ZAMARO *et al.*, 2002).

3.2.4 Análises moleculares

O estudo das mutações no gene da cadeia beta globínica foi realizado por meio da extração do DNA genômico, seguida da técnica da reação em cadeia mediada pela polimerase alelo específica (PCR-AE).

- **Extração do DNA genômico:** O DNA foi isolado de leucócitos, a partir de amostras de sangue total, colhidas em tubos contendo o anticoagulante EDTA. Foi utilizado protocolo padronizado e descrito na literatura (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1992).

- **Quantificação e verificação de pureza do DNA:** as amostras de DNA estudadas foram quantificadas no aparelho NanoDrop de marca Thermo.

- **Amplificação gênica pela Reação em cadeia de Polimerase:** as amostras de DNA do estudo foram amplificadas pela PCR (MULLIS-FALONA, 1987; SAIKI *et al.*, 1988) em termociclador. A PCR-AE processou-se em pelo menos dois tubos, sendo acrescentado em um deles, além dos produtos base, dois *primers*, um *sense* e outro *antisense* (que permitiam a verificação da funcionalidade da PCR) e um *primer* com sequência complementar à posição normal no genoma. No outro tubo foram acrescentados os mesmos dois *primers* iniciais e um *primer* com sequência complementar à região da mutação analisada. A identificação do genótipo, na dependência da verificação do produto amplificado, se deu da seguinte forma: se

a amplificação estivesse presente apenas no primeiro tubo, o indivíduo era normal para a mutação avaliada; se a amplificação positiva fosse verificada no tubo 1 e 2, se caracterizava um indivíduo heterozigoto para a mutação analisada; se o material amplificado obtivesse resposta apenas no tubo 2, se evidenciava um indivíduo homozigoto para a mutação analisada.

A amplificação gênica alelo específica foi utilizada para a identificação das mutações CD 39, IVS-I-1, IVS-I-6 e IVS-I-110 (BERTHOLO; MOREIRA, 2006), seguindo protocolo do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) - UNESP. As informações sobre os *primers* estão representadas na figura 8, já a sequência dos oligonucleotídeos e tamanho do fragmento após amplificação estão representadas no Quadro 3.

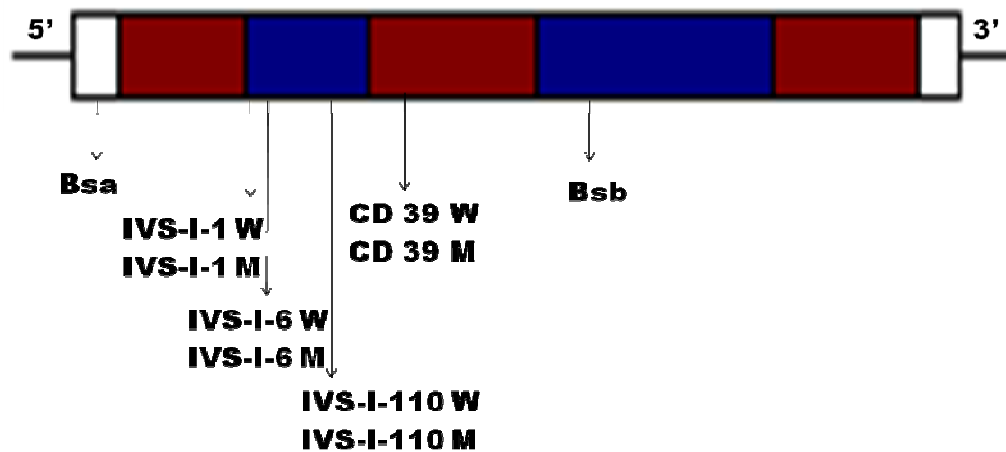


Figura 8- Representação esquemática da localização dos *primers* no gene da globina beta humana na caracterização molecular de β talassemia IVS-I-1, IVS-I-6, IVS-I-110 e CD 39. A cor vermelha caracteriza os éxons e a cor azul os íntrons. Bsa e Bsb são os *primers* de controle interno da reação.

Fonte: Adaptado de Bertholo, 2005.

Quadro 3 - *Primers* utilizados nas reações de PCR-AE para determinação de mutações nos genes da beta globina.

Primers	Sequências nucleotídicas	Tamanho do fragmento
B5a Controle interno da reação	5´ GGCTGTCATCACTTAGACCTCA 3´	659pb
B5b Controle interno da reação	5´AGAAGGGGAAAGAAAACATCAA 3´	659pb
CD 39 Alelo normal Antisense	5´ GACTCAAAGAACCTCTG 3´	439pb
CD 39 Alelo mutante Antisense	5´ GACTCAAAGAACCTCTA 3´	439pb
IVS-I-1 Alelo normal Antisense	5´ GTGACCTTGATACCAAC 3´	268pb
IVS-I-1 Alelo mutante Antisense	5´ GTAACCTTGATACCAA 3´	268pb
IVS-I-6 Alelo normal Antisense	5´ GTCTTGTAACCTTGATA 3´	273pb
IVS-I-6 Alelo mutante Antisense	5´ GTCTTGTAACCTTGATG 3´	273pb
IVS-I-110 Alelo normal Antisense	5´GGGTGGGAAAATAGACC3´	337pb
IVS-I-110 Alelo mutante Antisense	5´GGGTGGGAAAATAGACT 3´	337pb

Fonte: Adaptado de Fischell-Ghodsian; Hirsch; Bohlman, 1990.

Todas as amostras foram analisadas para as quatro mutações seguindo os seguintes protocolos:

CD 39 alelo normal: A reação foi realizada para um volume final de 25 µL. No “eppendorf” foram adicionados 8,0 µL de água ultrapura; 2,5 µL de tampão sem MgCl₂; 0,75 µL de MgCl₂, 1,0 µL de DMSO puro, 4,0 µL de dNTPs; 2,5 µL do oligonucleotídeo B5a; 2,5 µL do oligonucleotídeo B5b; 2,5 µL do oligonucleotídeo CD 39 alelo normal; 0,25 µL de *Taq* polimerase e 1 µL de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por 7 minutos; acrescida de 32 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 50 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 54°C por 50 segundos e extensão a 72°C por 50 segundos; e mais um último ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos, mantido a 4 °C por até no máximo 6 horas.

CD 39 alelo mutante: A reação foi realizada nas mesmas condições do alelo normal, com substituição do oligonucleotídeo normal pelo mutante.

IVS-I-1 alelo normal: A reação foi realizada para um volume final de 25 μ L. No “eppendorf” foram adicionados 8,0 μ L de água ultrapura; 2,5 μ L de tampão sem $MgCl_2$; 0,75 μ L de $MgCl_2$, 1,0 μ L de DMSO puro, 4,0 μ L de dNTPs 1,25 mM; 2,5 μ L do oligonucleotídeo B5a; 2,5 μ L do oligonucleotídeo B5b; 2,5 μ L do oligonucleotídeo IVS-I-1 alelo normal; 0,25 μ L de *Taq* polimerase e 1 μ L de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por 7 minutos; acrescida de 32 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 50 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 54°C por 50 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos; e mais um último ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos, mantido a 4 °C por até no máximo 6 horas.

IVS-I-1 alelo mutante: A reação foi realizada nas mesmas condições do alelo normal, com substituição do oligonucleotídeo normal pelo mutante.

IVS-I-6 alelo normal: A reação foi realizada para um volume final de 25 μ L. No “eppendorf” foram adicionados 7,85 μ L de água ultrapura; 2,5 μ L de tampão sem $MgCl_2$; 0,75 μ L de $MgCl_2$, 1,0 μ L de DMSO puro, 4,0 μ L de dNTPs 1,25 mM; 2,5 μ L do oligonucleotídeo B5a; 2,5 μ L do oligonucleotídeo B5b; 2,5 μ L do oligonucleotídeo IVS-I-6 alelo normal; 0,4 μ L de *Taq* polimerase e 1 μ L de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por 7 minutos; acrescida de 32 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 50 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 54°C por 50 segundos e extensão a 72°C por 50 segundos; e mais um último ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos, mantido a 4 °C por até no máximo 6 horas.

IVS-I-6 alelo mutante: A reação foi realizada nas mesmas condições do alelo normal, com substituição do oligonucleotídeo normal pelo mutante.

IVS-I-110 alelo normal: A reação foi realizada para um volume final de 25 μ L. No “eppendorf” foram adicionados 9,0 μ L de água ultrapura; 2,5 μ L de tampão sem $MgCl_2$; 1,5 μ L de $MgCl_2$, 1,0 μ L de DMSO 30%, 3,5 μ L de dNTPs 1,25 mM; 2,0 μ L do oligonucleotídeo B5a; 2,0 μ L do oligonucleotídeo B5b; 2,0 μ L do oligonucleotídeo IVS-I-110 alelo normal; 0,1 μ L de *Taq* polimerase e 1 μ L de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado

por uma desnaturação prévia de 95°C por 7 minutos; acrescida de 32 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 50 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 58°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 50 segundos; e mais um último ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos, mantido a 4 °C por até no máximo 6 horas.

IVS-I-110 alelo mutante: A reação foi realizada nas mesmas condições do alelo normal, com substituição do oligonucleotídeo normal pelo mutante.

Foram utilizadas nos protocolos as seguintes concentrações: tampão sem MgCl₂ 10x; MgCl₂ 50mM; dNTP 1,25 mM; *Taq* polimerase 5U/μL da marca Invitrogen e as reações de amplificação foram desenvolvidas no termociclador Eppendorf.

- **Análise do produto amplificado:** os resultados da amplificação foram verificados pela corrida eletroforética horizontal em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 volts por 30 minutos, e visualizados em câmara de UV (ultravioleta) após coloração com brometo de etídio.

3.2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o software livre R, disponível para download em www.r-project.org. A versão utilizada foi a 2.7.0. Inicialmente, foi feita uma análise descritiva dos dados qualitativos, com o objetivo de um melhor entendimento do comportamento das variáveis demográficas. Para comparação das variáveis qualitativas demográficas utilizou-se o teste Binomial (exato). Para comparação de medianas foram utilizados o teste Wilcoxon exato (quantis empíricos obtido via Bootstrap) e o teste de Kruskal-Wallis exato. O teste de Fisher foi utilizado com o objetivo de verificar as diferenças estatisticamente significantes entre as proporções observadas. Para a análise dos resultados fornecidos pelos testes estatísticos, foi escolhido como índice de significância $\alpha = 5\%$, portanto com um nível de confiança de 95%.

4 RESULTADOS

Dos 22 indivíduos, portadores de beta talassemia, estudados, quatro são do sexo masculino, caracterizando uma predominância de indivíduos do sexo feminino na amostra estudada. Com relação à etnia, apenas um indivíduo é branco, havendo uma predominância da etnia parda. Quanto à profissão, oito são domésticas, cinco são estudantes. Dentre as demais profissões observadas, cada uma referente a um único indivíduo, tem-se agricultor, artesão, auxiliar de enfermagem, costureira, escriturária, motorista, operador de produção e professor. Com relação à procedência, verifica-se que a maioria dos portadores da doença é proveniente da capital. (Tabela 1)

Tabela 1- Estratificação das características demográficas dos indivíduos portadores de beta talassemia e associação com a classificação clínica (n=22).

Variáveis	Beta talassemia intermediária (n=7)	Beta talassemia menor (n=15)	Valor p
Sexo			
Feminino	6 (33,3%)	12 (66,7%)	0,238
Masculino	1 (25,0%)	3 (75,0%)	0,625
Profissão			
Doméstica	3 (37,5%)	5 (62,5%)	0,727
Estudante	1 (20,0%)	4 (80,0%)	0,375
Etnia			
Branca	1 (100,0%)	-	1,000
Parda	6 (28,6%)	15 (71,4%)	0,078
Procedência			
Capital	2 (14,3%)	12 (85,7%)	0,013
Interior	5 (62,5%)	3 (37,5%)	0,727

Teste estatístico utilizado: Binomial (exato)

Ainda na tabela 1, apresentamos os resultados dos testes de comparação referentes à diferença entre a classificação clínica e os níveis das variáveis qualitativas demográficas. Para isso utilizamos o teste Binomial (CONOVER, 1999; HIGGINS, 2004). As únicas diferenças significativas ao nível de 5% foram referentes às diferenças entre as classificações para os indivíduos oriundos da capital e para os de etnia parda.

A idade dos portadores de beta talassemia variou entre 18 a 68 anos, com média de 44,7 anos. Além disso, pela análise descritiva, figura 9, podemos concluir que a distribuição dos indivíduos pertencentes à amostra é levemente assimétrica à direita. A maior parte dos indivíduos estudados (75%) tem idade superior a 35 anos.

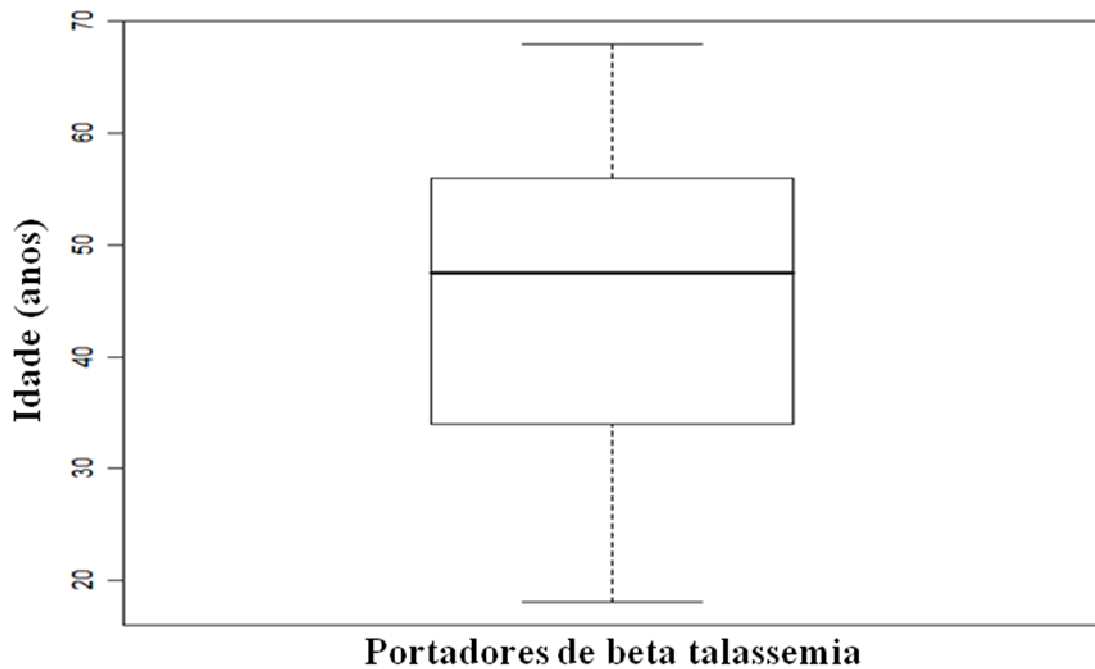


Figura 9- Box-Plot da idade (em anos) dos indivíduos portadores de beta talassemia.

A Figura 10 mostra o boxplot da idade dos indivíduos por tipo de classificação clínica. Usando o teste das somas das ordens de Wilcoxon exato (quantis empíricos obtido via Bootstrap) (DAVISON; HINKLEY, 1997) obteve-se uma estatística de teste igual a $W=53$ com respectivo valor de $p=0,9719$, evidenciando que não existe diferença significativa entre a idade mediana dos portadores de beta talassemia, para os dois grupos de classificação.

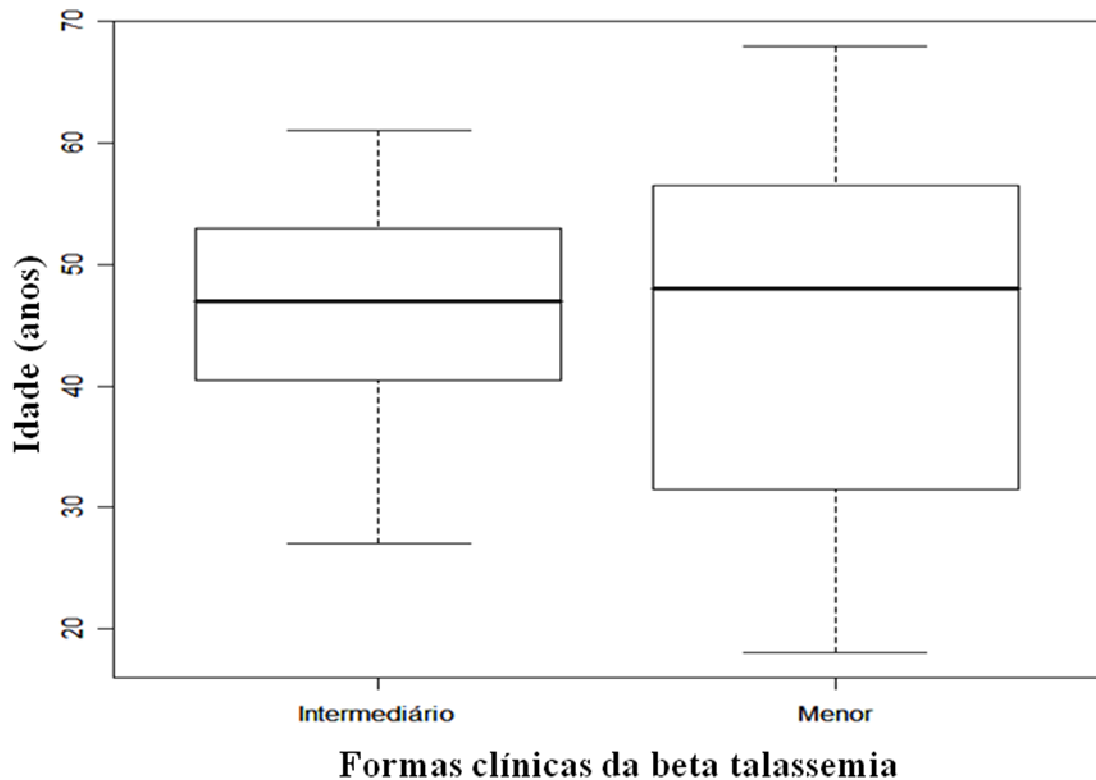


Figura 10- Idade (em anos) dos portadores de beta talassemia segundo sua classificação clínica.

As tabelas 2 e 3 mostram a estratificação das características demográficas, hematológicas e moleculares dos indivíduos em estudo. As mutações foram caracterizadas em 68,2% dos casos de beta talassemia, na qual 31,8% se mantiveram não caracterizadas. Podemos verificar que a maioria apresentou a mutação IVS-I-6, seguida da CD 39 e IVS-I-1. Já, em relação ao genótipo o grupo apresentou na sua maioria heterozigose para a mutação IVS-I-6, seguido de homozigose para IVS-I-6 e heterozigose para CD 39 e IVS-I-1. Os níveis da Hb, Hb F e da Hb A₂ se apresentaram de forma variável em relação ao genótipo.

Tabela 2- Características demográficas, hematológicas nos portadores de beta talassemia menor (n=15), ao diagnóstico, com o estudo molecular.

Pacientes	Sexo	I	Fenótipo	Genótipo		Hb	Hb F	Hb A ₂
5	F	68	TM	-	NENHUMA	8,75	0	5,1
6	F	49	TM	-	NENHUMA	10,1	1,2	3,4
7	F	55	TM	HETEROZIGOTO	CD 39	9,9	2,2	9,0
9	F	55	TM	HETEROZIGOTO	IVS-I-6	10,8	1,5	3,5
10	M	20	TM	HETEROZIGOTO	CD 39	12,7	0,5	5,7
11	F	44	TM	HETEROZIGOTO	IVS-I-1	10,3	2,2	5,6
12	F	64	TM	HOMOZIGOTO	IVS-I-6	12,5	1,3	4,0
14	F	29	TM	HETEROZIGOTO	CD 39	9,6	1,6	5,7
15	M	43	TM	HETEROZIGOTO	CD 39	11,8	2,1	3,9
16	F	34	TM	-	NENHUMA	9,19	1,6	5,6
18	F	18	TM	HETEROZIGOTO	IVS-I-6	10,3	0,7	4,0
19	M	48	TM	HETEROZIGOTO	IVS-I-6	11,6	1,2	5,3
20	F	60	TM	-	NENHUMA	10,9	0,8	5,8
21	F	18	TM	-	NENHUMA	9,7	1,1	5,4
22	F	58	TM	HETEROZIGOTO	IVS-I-6	10,6	0	4,0

Legenda: I= Idade em anos; Cd= Códon; IVS= Íntron; TI= Talassemia β intermediária; TM= Talassemia β menor; Hb= Hemoglobina (g/dL); HbA₂= Hemoglobina A₂ (%); HbF= Hemoglobina fetal (%); NENHUMA= nenhuma das mutações analisadas.

Tabela 3- Características demográficas, hematológicas nos portadores de beta talassemia intermediária (n=7), ao diagnóstico, com o estudo molecular.

Pacientes	Sexo	I	Fenótipo	Genótipo		Hb	Hb F	Hb A ₂
1	F	40	TI	HETEROZIGOTO	IVS-I-6	6,3	4,7	6,0
2	F	50	TI	HETEROZIGOTO	IVS-I-6	6,9	1,0	6,2
3	F	56	TI	-	NENHUMA	8,1	4,9	6,5
4	M	41	TI	HOMOZIGOTO	IVS-I-6	7,7	4,6	6,7
8	F	27	TI	-	NENHUMA	8,6	35	3,6
13	F	47	TI	HOMOZIGOTO	IVS-I-6	6,8	5,8	5,0
17	F	61	TI	HOMOZIGOTO	IVS-I-6	7,5	5,7	8,5

Legenda: I= Idade em anos; Cd= Códon; IVS= Íntron; TI= Talassemia β intermediária; TM= Talassemia β menor; Hb= Hemoglobina (g/dL); HbA₂= Hemoglobina A₂ (%); HbF= Hemoglobina fetal (%); NENHUMA= nenhuma das mutações analisadas.

Na tabela 4 verificamos que dos 68,2% indivíduos com mutação caracterizada, 10 (45,5%) correspondem à mutação IVS-I-6, sendo cinco com diagnóstico clínico de beta talassemia intermediária e cinco de talassemia menor. Das 31,8% mutações não caracterizadas cinco foram diagnosticadas como beta talassemia menor. Não houve associação entre as mutações e os fenótipos.

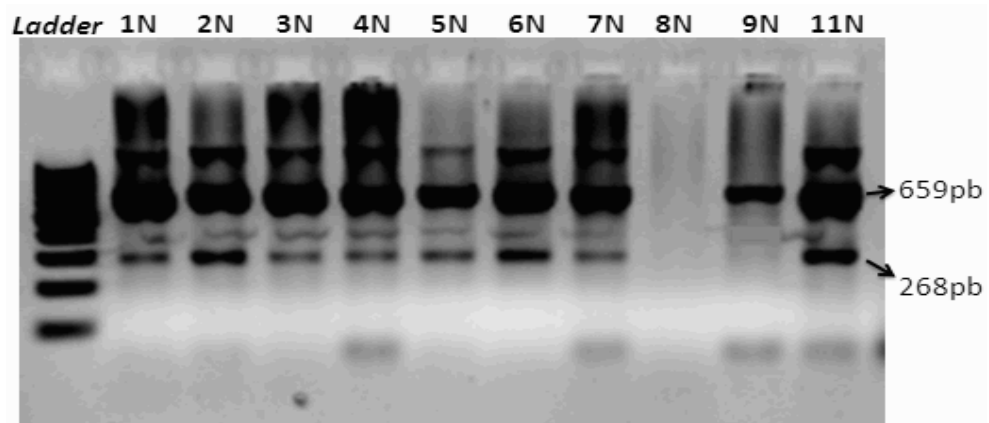
Tabela 4- Distribuição dos indivíduos portadores de beta talassemia quanto ao tipo de mutação e o fenótipo.

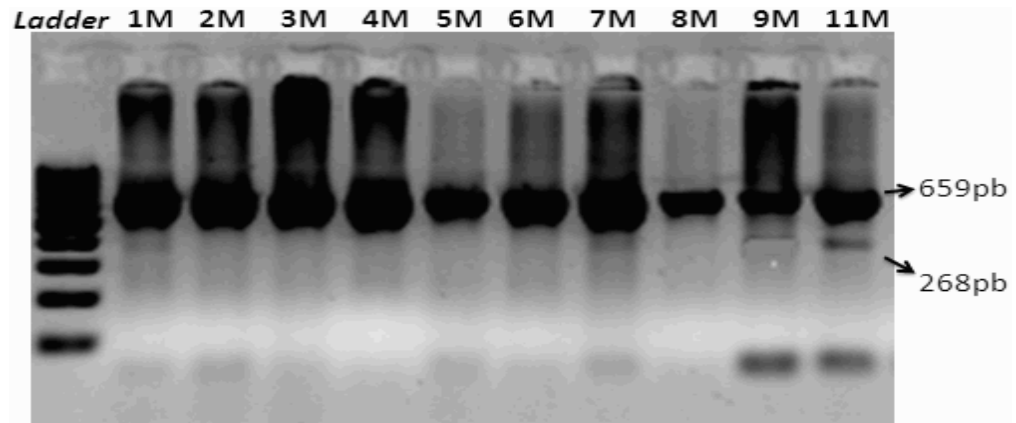
Mutação	N de indivíduos (%)	β talassemia intermediária	β talassemia menor	Valor de p
IVSI-1	1 (4,5%)	0	1	-
IVSI-6	10 (45,5%)	5	5	1,00
IVSI-110	-	-	-	-
CD 39	4 (18,2%)	-	4	-
Outras	7 (31,8%)	2	5	0,59
Total	22 (100%)	7	15	0,35

Outras: mutações não caracterizadas no estudo.

Teste estatístico utilizado: Teste de Fisher

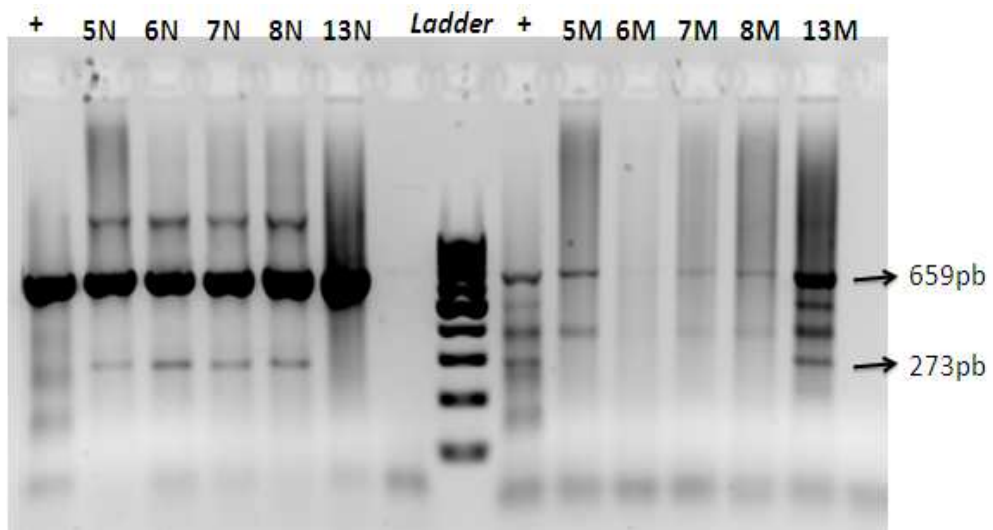
Nas figuras 11, 12, e 13, observamos exemplos de indivíduos portadores de beta talassemia heterozigotos para IVS-I-1, homozigotos para IVS-I-6 e heterozigotos para CD 39, respectivamente. A figura 14 demonstra a ausência do alelo mutante para a mutação IVS-I-110.





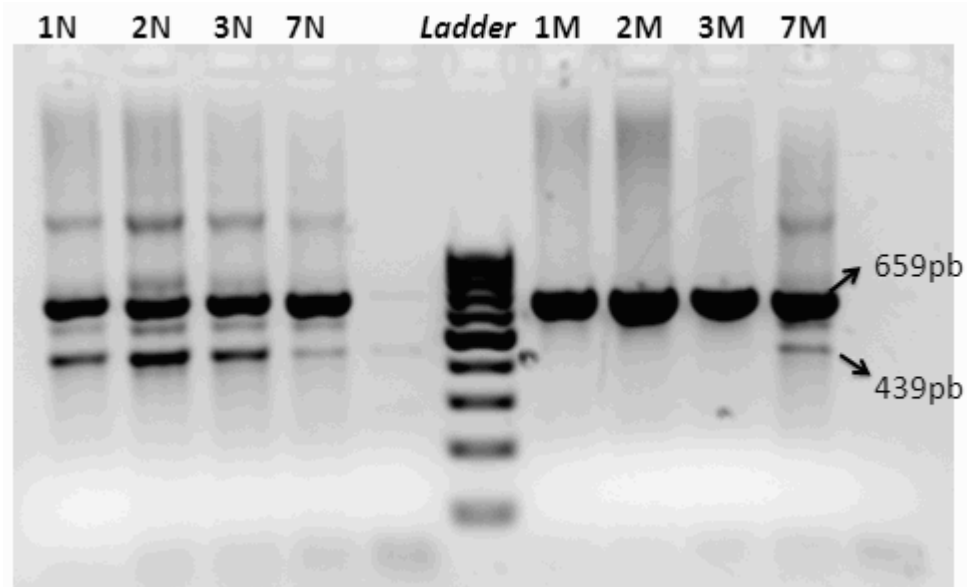
Legenda- N- alelo normal; M- alelo mutante; *Ladder*- marcador de peso molecular 100pb.

Figura 11- Foto de um gel de agarose 1,5% com amostra de heterozigoto para a mutação IVS-I-1 no indivíduo de número 11.



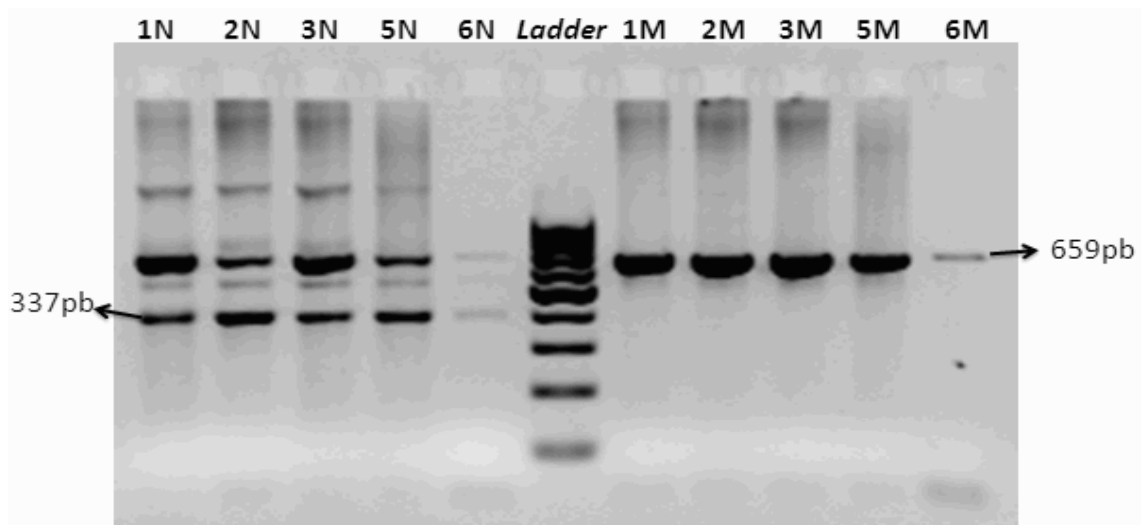
Legenda- N- alelo normal; M- alelo mutante; *Ladder*- marcador de peso molecular 100pb;
(+) - controle positivo

Figura 12- Foto de um gel de agarose 1,5% com amostra de homozigoto para a mutação IVS-I-6 no indivíduo de número 13.



Legenda- N- alelo normal; M- alelo mutante; *Ladder*- marcador de peso molecular 100pb.

Figura 13- Foto de um gel de agarose 1,5% com amostra de heterozigoto para a mutação CD 39 no indivíduo de número 7.



Legenda- N- alelo normal; M- alelo mutante; *Ladder*- marcador de peso molecular 100pb.

Figura 14- Foto de um gel de agarose 1,5% com amostra sem o alelo mutante para a mutação IVS-I-110.

Na Figura 15, estão apresentados os boxplots dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e níveis de Hb F e Hb A₂ nos portadores de beta talassemia, ao diagnóstico, de acordo com o tipo de mutação. Aplicamos o teste de Kruskal-Wallis exato (obtido via Bootstrap) para verificar se a mediana dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e níveis de

Hb F e Hb A₂ nos portadores de beta talassemia, ao diagnóstico, é a mesma para os três tipos de mutações. Não obtivemos diferença significativa, ao nível de 5%, em nenhuma das comparações. Rejeitou-se a hipótese de igualdade entres os valores medianos para os três tipos de mutações. A mutação IVS-I-1 foi caracterizada em apenas um paciente impossibilitando a análise estatística.

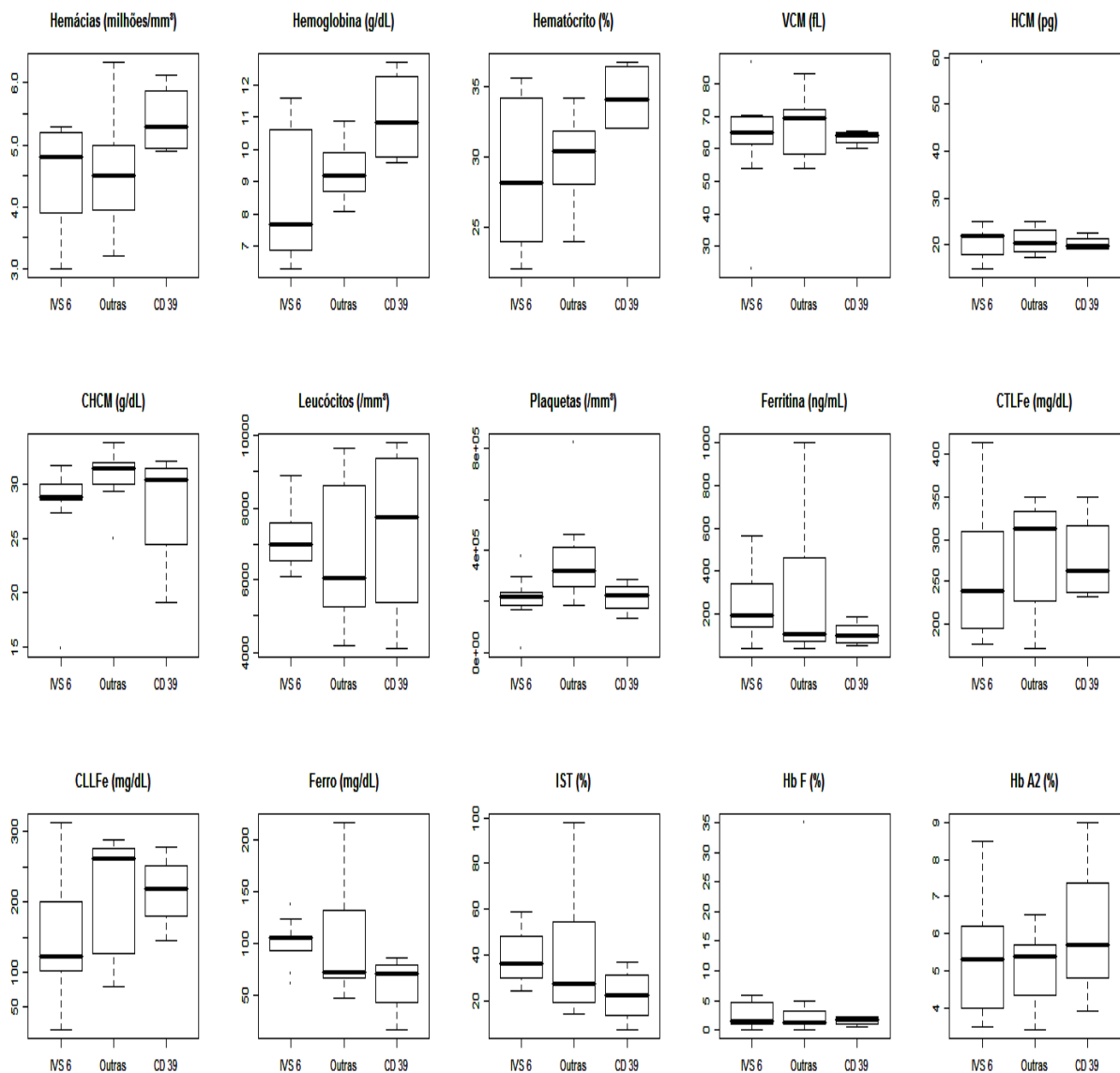


Figura 15- Boxplot dos valores dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e níveis de Hb F e Hb A₂ nos portadores de beta talassemia, ao diagnóstico, de acordo com o tipo de mutação.

A Figura 16 mostra os boxplots dos parâmetros Hb (g/dL), VCM (fL), HCM (pg), ferritina (ng/mL), Hb F(%) e Hb A₂ (%) dos homozigotos e heterozigotos para a mutação IVS-I-6. Aplicamos os testes exatos de Wilcoxon para comparação dos valores medianos para os parâmetros Hb (g/dL), VCM (fL), HCM (pg), ferritina (ng/mL), Hb F(%) e Hb A₂ ao diagnóstico dos indivíduos com mutação IVS-I-6 segundo os níveis do genótipo. Em nenhuma das situações teve uma diferença significativa ao nível de 5%. Por outro lado, se considerarmos um nível de 10%, a hemoglobina fetal apresentaria diferença significativa. Vale ressaltar, que apesar do teste ser exato, o mesmo só consegue captar diferenças muito significativas, para o tamanho de amostra dado.

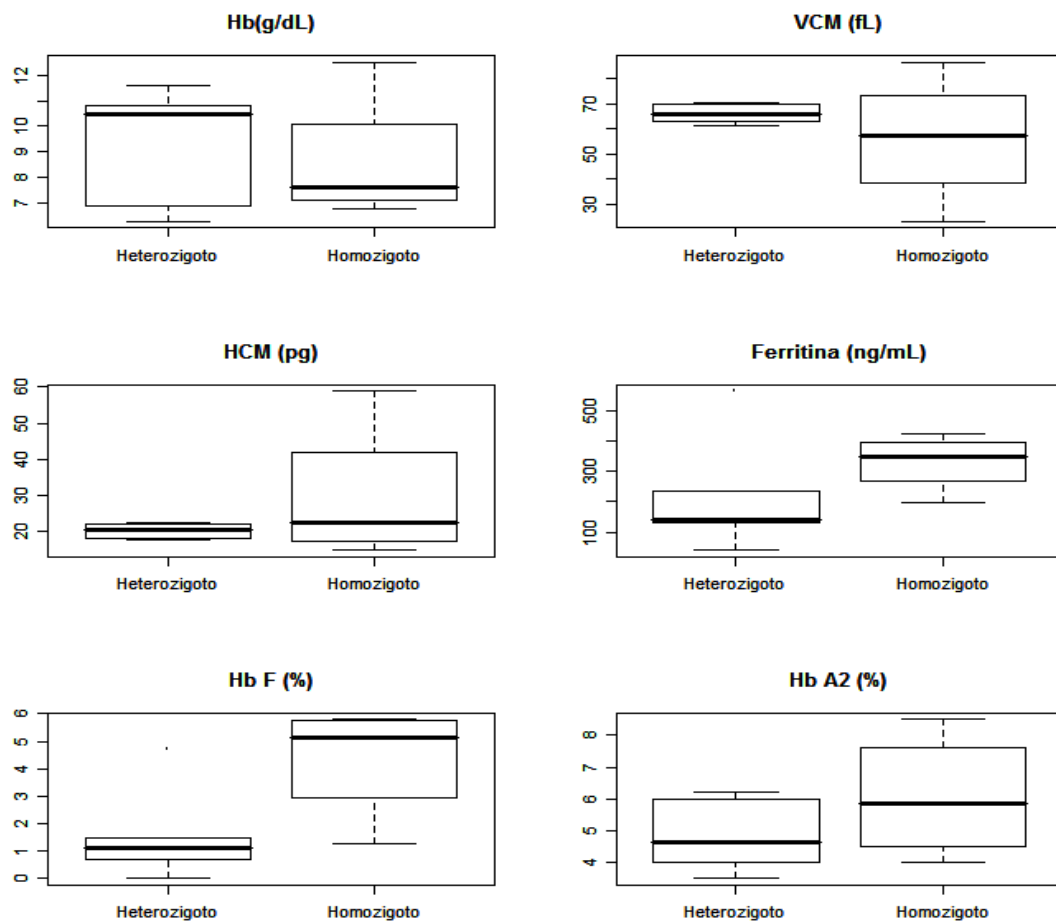


Figura 16- Boxplot dos valores dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e níveis de Hb F e Hb A₂ nos pacientes com β talassemia, ao diagnóstico, de acordo com o genótipo dos pacientes com mutação IVS-I-6.

Na mutação IVS-I-6 as manifestações clínicas mais frequentes foram cefaleia, fadiga, tontura e edema de membros inferiores. Esta última foi a mais prevalente na mutação

CD 39. Em outras mutações não caracterizadas os sintomas mais frequentes foram fadiga, tontura, hepatomegalia e edema de membros inferiores. O único paciente com a mutação IVS-I-1 apresentou um quadro clínico caracterizado por tontura, icterícia e esplenomegalia. Na Tabela 5, apresentamos o teste exato de Fisher, a fim de verificar se existe dependência entre os níveis das manifestações clínicas e o tipo de mutação (IVS-I-6 e CD 39). Em nenhuma das 13 comparações, tivemos uma diferença significativa, evidenciando nenhum tipo de tendência por parte dos pacientes com determinado tipo de mutação.

Tabela 5- Comparação das mutações IVS I-6 e CD 39 com as manifestações clínicas, ao diagnóstico.

Manifestações Clínicas	IVS-I-6	CD 39	Valor de p
Adinamia	2/10	0/4	1,000
Dispneia	2/10	1/4	1,000
Cefaleia	5/10	1/4	0,580
Fadiga	5/10	1/4	0,580
Tontura	5/10	2/4	0,521
Sonolência	3/10	1/4	1,000
Icterícia	3/10	0/4	0,521
Esplenomegalia	4/10	0/4	0,251
Hepatomegalia	2/10	0/4	1,000
Edema de membros inferiores	5/10	3/4	0,580
Constipação	1/10	1/4	0,506
Gastrite	1/10	0/4	1,000
Litíase	1/10	0/4	1,000

Teste utilizado: Teste exato de Fisher

5 DISCUSSÃO

A beta talassemia corresponde a um grupo de doenças hereditárias da hemoglobina caracterizada pela redução da síntese da cadeia β e subsequente desequilíbrio na relação das cadeias globínicas (α ou β) podendo resultar em anemia hemolítica crônica. As mutações que afetam o gene da globina β levam à redução (β^+) ou ausência (β^0) da síntese das mesmas, resultando em três principais fenótipos clínicos: beta talassemia maior, intermediária e menor (CAO; GALANELLO, 2010).

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

Em relação à avaliação molecular da beta talassemia os estudos no Brasil se concentram mais nas regiões sul e sudeste, logo o presente estudo é relevante por ser pioneiro no estado no Ceará, além de propiciar estratégias de tratamento e de aconselhamento genético na população estudada e de contribuir para o aumento de dados da literatura acerca do padrão molecular dos pacientes do referido estado.

A idade dos indivíduos portadores de beta talassemia variou de 18 a 68 anos com média de 44,7 anos. Esse fato se deve, provavelmente, à maioria dos portadores apresentarem fenótipo de beta talassemia menor, que cursa com quadro clínico mais brando. Estudo realizado por Reichert e colaboradores (2008) em 127 indivíduos com beta talassemia, em Porto Alegre-RS demonstrou que a idade dos pacientes variou de três meses a 94 anos, com média de 37 anos. Portanto, a média de idade se assemelha a nossa, provavelmente devido ao fato dos pacientes também apresentarem fenótipo de beta talassemia menor na maioria dos casos. Uma melhor compreensão da fisiopatologia da doença, o diagnóstico mais precoce, o uso de quelantes orais isolados ou em associação tem aumentado a sobrevida dos pacientes com beta talassemia (SONATI; COSTA, 2008).

Em relação ao sexo houve um predomínio do sexo feminino. Resultado semelhante foi obtido pelo grupo de Reichert e colaboradores (2008). Já Rahimi, Muniz e Parsian (2010) demonstraram um predomínio no sexo masculino quando avaliaram 185 pacientes com β talassemia do Iran, sendo 74 do sexo feminino e 111 do sexo masculino. O resultado, portanto reforça dados da literatura científica de que não existe diferença na prevalência da doença em relação ao sexo. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no último censo realizado em 2007, havia 6.494 mulheres a mais em relação aos homens no estado do Ceará.

Quanto à etnia, a grande maioria dos indivíduos foi de etnia parda. Os resultados corroboram com os dados da literatura onde demonstram que no nordeste do Brasil a maioria da população é de etnia parda, em decorrência da miscigenação entre escravos (africanos), europeia e indígena (BERTHOLO; MOREIRA, 2006).

Todos os portadores de beta talassemia do estudo têm naturalidade cearense, sendo a maioria procedente da capital. Atualmente o serviço de Hematologia e Hemoterapia do Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC) da Universidade Federal do Ceará possui 30 pacientes adultos com diagnóstico clínico de beta talassemia (intermediária e menor), em acompanhamento no ambulatório do Hemocentro do Estado Ceará - Hemoce, sendo considerado centro de referência da doença no estado. Quanto à ocupação houve predomínio da profissão doméstica, isso se deve provavelmente a elevada relação do sexo feminino/masculino e/ou ao baixo grau de escolaridade associado ao baixo nível socioeconômico dos participantes atendidos nesse ambulatório da rede pública estadual.

Embora mais de 200 alelos de beta talassemia tenha sido caracterizado (HbVar, <http://globin.cse.psu.edu/globin/hbvar/>), o espectro das mutações difere entre os grupos étnicos em cada população e, em geral, poucas mutações são mais comuns, com um número variável de mutações raras (FLINT *et al.*, 1998). As mutações β talassêmicas que acometem a população brasileira têm origem Mediterrânea. Nesta região mais de trinta alelos da doença já foram descritos, porém somente oito mutações pontuais são as mais comuns (ROLDAN *et al.*, 1997). Os imigrantes que auxiliaram na formação do povo brasileiro, foram responsáveis pelo aparecimento de quatro dessas mutações representadas pelo códon 39, IVS-I-1, IVS-I-6 e IVS-I-110, sendo as duas primeiras do tipo β^0 e as duas últimas do tipo β^+ .

A população do sudeste do Brasil difere do padrão geral pela descendência de portugueses, italianos, espanhóis e alemães. A frequência de heterozigotos para beta talassemia na população caucasóide do Sudeste do país é de 0,8 a 1,3% (ZAGO *et al.*, 1983; RAMALHO *et al.*, 1999) e entre paulistas descendentes de italianos não miscigenados é em

torno de 6,4% (RAMALHO, 1976). Já o sul do Brasil foi colonizado principalmente por italianos do Norte (no final do século XIX) e do sudeste da Itália (o final do século XX) (FROSI; MIORANZA, 1975). No Nordeste o padrão de colonização difere do sul e sudeste do país. O estado de Pernambuco apresenta colonização europeia (principalmente holandesa) e africana. Já o padrão de colonização do estado do Ceará difere do de Pernambuco. No Ceará não houve influxo maciço de europeus e nem de africanos, a colonização se deu de forma pouco expressiva por parte dos portugueses, africanos e judeus, além da influência indígena. Pernambuco apresenta frequência estimada de 0,7% de beta talassemia heterozigótica (ALMEIDA *et al.*, 2005). Já, no estado do Ceará não há referência da frequência de beta talassemia.

A população brasileira formou-se a partir de três grupos étnicos básicos: o indígena, o branco e o negro. A intensa miscigenação ocorrida entre esses grupos deu origem aos numerosos mestiços ou pardos (fruto do cruzamento das demais etnias com o índio). Sobre essa base juntaram-se, além dos portugueses, que desde a colonização continuaram entrando livre e regularmente no Brasil, vários outros povos imigrantes, ampliando e diversificando ainda mais a formação étnica da população brasileira. Os principais grupos de imigrantes que entraram no Brasil após a independência (1822) foram os seguintes: atlanto-mediterrâneos (italianos e espanhóis), germanos (alemães), eslavos (poloneses e ucranianos) e asiáticos (japoneses). A população brasileira é, assim, caracterizada por grande diversidade étnica e intensa miscigenação (SOUZA, 2004).

A ocupação das terras cearenses, em razão da hostilidade dos índios, das asperezas do clima e da escassez de água por secas periódicas, foi diferente do processo ocorrido em outras regiões no Nordeste. Foi um processo mais lento e de modo tardio e só teve início após a luta contra os holandeses. Vieram emigrantes do Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco. Aos poucos, africanos e afro-brasileiros cativos foram se incorporando ao processo de ocupação das terras e da construção da história da sociedade cearense. Porém, o negro africano vindo como escravo quase não repercutiu na miscigenação do povo cearense (OLIVEIRA, 1982; POMPEU; TASSIGNY, 2004; SOUZA, 2004).

Como já anteriormente mencionado os estudos moleculares realizados no Brasil para beta talassemia são raros e na sua maioria restrita ao estado de São Paulo. Nesse estado, segundo dados da ABRASTA- Associação Brasileira de Talassemia (www.abrasta.org.br) é onde está localizado o maior número dos casos mais graves de talassemia. Nas regiões Sudeste e Sul a doença tem origem predominantemente italiana, sobressaindo-se a mutação

códon 39 que causa uma forma mais grave da doença, enquanto que em Pernambuco a mutação IVS-I-6, forma mais comum parece ter sido introduzida pelos portugueses, no período inicial da colonização (OLIVEIRA, 1982; POMPEU; TASSIGNY, 2004; SOUZA, 2004).

Neste estudo as mutações foram caracterizadas em 68,2% dos casos de beta talassemia. A mutação mais frequente foi a IVS-I-6 que esteve presente em 14 dos 44 alelos estudados, ou seja, 45,5%, seguida da CD 39 (18,2%) e IVS-I-1 (4,5%). Pesquisadores têm demonstrado, no Brasil, diferentes perfis de mutações para beta talassemia com maior frequência da IVS-I-110 e CD39 no sul do país (REICHERT, 2006), de IVS-I-6 no nordeste (ARAÚJO *et al.*, 2003), IVS-I-110 e a CD39 na região sudeste do país (COSTA; TAVELA, ZAGO, 1990; FONSECA *et al.*, 1998). Araújo *et al.*, (2003) demonstraram, em estudo com β talassêmicos em Pernambuco, uma frequência maior da mutação IVS-I-6. Esses pesquisadores além de demonstrar que o quadro das mutações difere em frequência com as regiões sul e sudeste, também verificaram a presença da mutação IVS-I-5, pouco frequente no Brasil. Nossos resultados, portanto, corroboram com os dados observados em Pernambuco.

Pesquisas internacionais demonstram também uma heterogeneidade no padrão de mutação para beta talassemia. Rahim (2009) ao estudar 340 pacientes com β talassemia na Índia verificaram que as mutações mais frequentes foram a IVS-II-I, CD 36/37 e IVS-I-110, seguida da IVS-I-6 e uma minoria de códon 39 e IVS-I-1. Darwish, El-Khatib E Ayesh (2005) mostraram que as mutações β talassêmicas de maior prevalência na Palestina foram IVS-I-6, seguida de IVS-I-110, IVS-I-1 e CD 39. Rahimi, Muniz e Parsian (2010) verificou que os pacientes β talassêmicos do Irã apresentaram com maior frequência a IVS-I-110, seguida da IVS-I-1, IVS-I-6 e CD 39. Estudo feito, por Cabeda *et al.* (1999), em pacientes com β talassemia em Portugal revelou que a mutação mais prevalente é a CD 39, seguida da IVS-I-1, IVS-I-6 e IVS-I-110. Roldan *et al.* (1997) demonstraram o perfil molecular de pacientes com β talassemia na Argentina com predomínio da mutação do códon 39, seguida da IVS-I-110, IVS-I-1 e IVS-I-6.

A IVS-I-6 é uma mutação β^+ leve e diversos estudos têm demonstrado que a mesma está associada a quadros clínicos mais leves da talassemia (COSTA; TAVELA; ZAGO, 1991; WAYE *et al.*, 1995; HO *et al.*, 1998; ARAÚJO *et al.*, 2003). Em homozigose, a IVS-I-6 predomina os quadros de beta talassemia intermediária (EFREMOV *et al.*, 1994; RUND *et al.*, 1997; QATANANI *et al.*, 2000; ARAÚJO, 2003; EL-LATIF *et al.*, 2002). Efremov *et al.* (1994), um dos primeiros pesquisadores a definir o caráter de homozigose para beta talassemia, demonstrou que homozigotos tinham uma forma clínica relativamente leve de

beta talassemia intermediária. No presente estudo dos quatros pacientes homozigotos para IVS-I-6, três apresentavam fenótipo de beta talassemia intermediária e um beta talassemia menor. Dos seis pacientes heterozigotos para a mutação, dois apresentaram fenótipo de beta talassemia intermediária e quatro com beta talassemia menor. A discrepância entre os fenótipos e os genótipos no presente estudo se deve provavelmente a presença de outra mutação não estudada no gene beta ou a co-expressão com alfa-talassemia (FLINT *et al.*, 1998).

Alguns fatores podem ser capazes de reduzir o desequilíbrio entre as cadeias globínicas resultando em uma forma mais leve de talassemia. Entre esses, podemos citar a presença de pelo menos um alelo β talassêmico silencioso ou leve, associado à alta produção de cadeias globínicas β , e co-herança com talassemia α ou determinantes genéticos que aumentam a produção de cadeias γ (GALANELLO; CAO, 1998; HO *et al.*, 1998). As bases moleculares da beta talassemia intermediária podem variar de uma população para outra, dependendo da prevalência de alguns desses fatores (THEIN, 1998, 2005).

A mutação -101 (C \rightarrow T) tem sido observada com frequência na região do Mediterrâneo. Ela interage com uma variedade de alelos beta talassêmicos para produzir formas moderadas de beta talassemia intermediária (WEATHERALL, 2001). A variabilidade genotípica em *loci* conhecidos é, muitas vezes, insuficiente para explicar os diferentes fenótipos dos doentes com o mesmo genótipo (RUND, 2005).

A mutação IVS-I-5 é considerada como a de maior prevalência no subcontinente indiano (TUZMEN; SCHECHTER, 2001). Na Índia, num estudo para diagnóstico Pré-Natal realizado por Varawalla *et al.* (1991), a IVS-1-5 (G \rightarrow C) foi detectada em 38,3% dos alelos estudados. No Paquistão, Khan e Riazuddin (1998) encontraram a mutação IVS-1-5 (G \rightarrow C) em 37,7% dos alelos, evidenciando assim a grande frequência dessa mutação no Oriente. No Brasil, esta mutação foi observada por Araújo *et al.*, (2003) em Pernambuco em 9,3%. Logo, a pesquisa para a referida mutação deve ser instituída tanto na região nordeste como nas demais.

A mutação do códon 39 foi a segunda mais frequente no estudo, sendo todos heterozigotos para a mutação e com fenótipo de β talassêmico menor. Este fato pode ser atribuído a vários fatores, dentre eles a descendência bem como a pequena amostragem. A mesma é mais frequente na região do Mediterrâneo e no Brasil nos estados do sudeste, fato já exposto anteriormente nesse contexto. Na forma homozigótica corresponde a beta talassemia maior e em heterozigose cursa com manifestações mais leves (MORENO; BOLUFER; PEREZ, 1999). A mutação IVS-I-1 β^0 , foi representada neste estudo por somente um paciente

diagnosticado como beta talassemia menor. Assim como a do códon 39, a mutação IVS-I-1 em homozigose corresponde a beta talassemia maior. Segundo dados da literatura (COSTA; TAVELA; ZAGO, 1990; FONSECA *et al.*, 1998; REICHERT, 2006) a mutação mediterrânea IVS-I-110 apresenta uma alta frequência nas regiões Sul e Sudeste.

Na avaliação de associação entre as variáveis: contagem de hemácias, Hb, Ht, VCM, HCM, CHCM, ferro sérico, ferritina, CTLFe, CLLFe, IST, Hb F e Hb A₂ com as mutações IVS-I-6, códon 39 e outras mutações (não caracterizadas) demonstrou-se não haver diferença significativa. Reichert e colaboradores (2008) demonstraram uma diferença significativa das variáveis VCM, HCM, CHCM e Hb A₂ entre os pacientes com a mutação IVS-I-6 em relação às outras mutações (IVS-I-1, IVS-I-110 e códon 39).

Ao se avaliar a mutação IVS-I-6 em homozigose e em heterozigose para as variáveis: Hb, VCM, HCM, Ferritina, Hb F e Hb A₂, verificamos que não houve diferença significativa. Bertuzzo, Sonati e Costa (1997), demonstraram que níveis elevados de HCM e de Hb A₂ podem estar associados com a presença de mutações brandas de talassemia como no caso de heterozigotos para IVS-I-6 quando comparados aos heterozigotos para as mutações no códon 39 e IVS-I-1.

A discrepância entre o fenótipo e o genótipo em alguns portadores no presente estudo, provavelmente se deva a co-expressão do genótipo alfa. Em muitas populações em que a beta talassemia é prevalente, a alfa também ocorre com alta frequência, e por isso não é incomum a co-herança de ambas as condições. Homozigotos ou heterozigotos compostos para beta talassemia com co-herança com alfa talassemia levam à uma redução do excesso de cadeias α e menor formação de corpos de inclusão nos precursores eritróides, e com isso tendem a ter uma condição menos grave (GALANELLO; CAO, 1998; THEIN, 2005). Essa interação proporciona bases para uma considerável heterogeneidade clínica; os níveis de melhora dependem da gravidade do alelo β talassêmico e do número de genes α funcionais (THEIN, 2005).

Entretanto, tendo em vista que cada combinação pode estar associada a uma ampla variação na apresentação clínica, a definição do genótipo α globínico em um único paciente pode não ter um valor absoluto na predição do fenótipo clínico (GALANELLO; CAO, 1998; THEIN, 2005).

Em heterozigotos para beta talassemia, a co-herança de talassemia α normaliza a microcitose e hipocromia, enquanto que a presença de genes α extras aumenta o desequilíbrio, podendo converter um estado tipicamente assintomático para uma talassemia intermediária. Na maioria dos casos, isso é relatado pela co-herança de genes α globínicos triplicados. Genes

α triplicados ($\alpha\alpha\alpha$) ocorrem com baixa frequência em muitas populações. A co-herança de dois genes α extras ($\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$ ou $\alpha\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$) com heterozigotos para beta talassemia resulta em talassemia intermediária. Entretanto, o fenótipo de um gene α extra ($\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$) com heterozigotos para a beta talassemia é muito variável e depende da gravidade do alelo da beta talassemia (THEIN, 2005).

Traeger-Synodinos *et al.*, (1997) estudaram em pacientes gregos heterozigotos para beta talassemia, o desequilíbrio das cadeias α/β e mostraram que um único gene adicional, como por exemplo, a triplicação anti- $\alpha^{3.7}$, normalmente pode gerar uma anemia acentuada em heterozigotos beta talassêmicos, enquanto que em homozigose a mesma triplicação pode induzir um fenótipo de talassemia intermediária. Isto sugere que a triplicação do gene α interage com a mutação da beta talassemia para causar excesso de cadeias α equivalente ao observado na beta talassemia intermediária homozigótica (FALLAH *et al.*, 2009). Isto se aplica em regra geral, entretanto devido a grande variabilidade do genótipo, não descreve o padrão de classificação de diferentes fenótipos disponíveis de talassemia. Apesar de relatos em populações, a definição de parâmetros comuns em portadores de beta talassemia em associação com triplicações do gene α continua a ser um problema. Agravamento do fenótipo da beta talassemia heterozigótica continua a ser geralmente inexplicáveis e sua associação com o aumento da expressão do gene α são muitas vezes pouco elucidados (TRAEGER-SYNODINOS *et al.*, 1997).

Estudo feito por Hartevelde *et al.* (2008) descreveu dois casos de portadores de beta talassêmicos, heterozigotos para a mutação no códon 39, ambos apresentando um fenótipo de talassemia intermediária, um dos quais era dependente de transfusão sanguínea, resultantes de dois novos rearranjos diferentes do gene α . Estes rearranjos produzem uma duplicação do *locus* α , incluindo a região HS-40, levando a um alelo com quatro genes α expressos que, atualmente, só pode ser detectado usando a tecnologia MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) (SOLLAINO *et al.*, 2009; FAÀ *et al.*, 2010).

Esses resultados, em seu conjunto, revelam a heterogeneidade das bases moleculares da beta talassemia em indivíduos adultos no estado do Ceará. A região Nordeste, portanto, parece apresentar um perfil molecular diferente das demais regiões do Brasil, tendo como justificativa a dinâmica de colonização, como já citado anteriormente, no entanto há necessidade de estudos em todo o país, para estabelecer políticas adequadas de saúde pública e serviços de diagnóstico.

6 CONCLUSÕES

A maioria dos indivíduos portadores de beta talassemia possui idade entre 41 e 50 anos, são do sexo feminino, de etnia parda, domésticas e procedentes da capital do Ceará;

A mutação mais prevalente foi a IVS-I-6, sendo que quatro pacientes apresentaram homozigose e seis heterozigose, seguida do códon 39. A mutação IVS-I-I foi encontrada em apenas um paciente e a IVS-I-110 não foi encontrada.

Não houve diferença significativa entre as diferentes mutações IVS-I-6, CD 39 e as outras mutações (não caracterizadas) e os parâmetros do hematócrito, Hb, Ht, VCM, HCM, CHCM, leucócitos, plaquetas, níveis séricos de ferritina, ferro sérico, CTLFe, CLLFe, IST, HbF% e HbA₂%.

Os resultados deste primeiro estudo molecular de beta talassemia do estado do Ceará reforçam o predomínio da mutação IVS-I-6 no nordeste do Brasil, mutação relacionada com prognóstico favorável, em pacientes adultos com beta talassemia, no estado do Ceará, caracterizados por quadros clínicos variáveis, porém todos de pouca gravidade.

REFERÊNCIAS

ADORNO, E. V.; MOURA NETO, J. P.; LYRA, I.; ZANETTE, A.; SANTOS, L. F. O.; SEIXAS, M. O.; REIS, M. G.; GONÇALVES, M. S. Sequence change in the HS2-LCR and γ -globin gene promoter region of sickle cell anemia patients. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 41, p. 95-98, 2008.

AESSOPOS, A.; BERDOUKAS, V.; TSIRONI, M. The heart in transfusion dependent homozygous thalassaemia today--prediction, prevention and management. **Eur. J. Haematol.**, v. 80, p. 93-106, 2007.

ALMEIDA, M. I. M.; SILVA, I. S.; BORBA, M. F. A.; PEREIRA, C. O.; BEZERRA, A. C. R.; LIMA, M. C. T. N. Incidência das Hemoglobinopatias mais frequentes diagnosticadas no laboratório municipal de Saúde Pública do Recife no Período de Novembro 2002 a Dezembro 2004. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL, 39., 2005. **Anais...**

ANTONARAKIS, S. E.; KAZAZIAN JÚNIOR, H.; ORKIN, S. H. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin cluster. **Human Genet.**, v. 69, p. 1-14, 1985.

ARAÚJO, A. S.; SILVA JR, W. A.; LEÃO, S. A. C.; BANDEIRA, F. C. G.; PETRON, M.; MODELL, B.; ZAGO, M. A. A different molecular pattern of β -thalassemia mutations in Northeast Brazil. **Hemoglobin**, v. 27, v. 4, p. 211-217, 2003.

ATAGA, K. I.; CAPPELLINI, M. D.; RACHMILEWITZ, E. A. Beta-thalassaemia and sickle cell anaemia as paradigms of hypercoagulability. **Br. J. Haematol.**, v. 139, p. 3-13, 2007.

BANK, A. Understanding globin regulation in β -thalassemia: it's a sample as α , β , γ , δ . **J. Clin. Invest.**, v.115, n. 6, p. 1470-1473, 2005.

_____. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. **Blood.**, v. 107, n. 2, p. 435-443, 2006.

BARTON, P.; MALCOLM, S.; MURPHY, C. S.; FERGUSON-SMITH, M. A. Localization of the human alpha-globin gene cluster to the short arm of chromosome 16 (16 p12-16pter) by hybridization *in situ*. **J. Mol. Biol.**, v. 156, p. 269-278, 1982.

BENOIST, C.; O'HARE, K.; BREATHNACH, R.; CHAMBON, P. The ovalbumin gene-sequence of putative control regions. **Nucleic Acids Res.**, v. 8, n. 1, p. 127-142, 1980.

BERTHOLO, L. C. **Amplificação gênica alelo específica e multiplex no diagnóstico laboratorial de hemoglobinas anormais**, 2005. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, 2005.

BERTHOLO, L. C.; MOREIRA, H. W. Amplificação gênica alelo-específica na caracterização das hemoglobinas S,C e D e as interações entre elas e talassemias beta. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n. 4, p. 245-251, 2006.

BERTUZZO, C. S.; SONATI, M. F.; COSTA, F. F. Hematological phenotype and the type of β thalassemia mutation in Brazil. **Braz. J. Gen.**, v. 20, n. 2, p. 319-321, 1997.

BETKE, K.; MARTI, N. R.; SCHLICHT, I. Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. **Nature**, v. 184, p. 1877- 1878, 1959.

BONINI-DOMINGOS, C. R. **Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinopatias e talassemias**. São Paulo: HN, 2006.

_____. Thalassemia screening in Brazil – results for 20 years. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 26, n. 4, p. 288-289, 2004.

BONINI-DOMINGOS, C. R.; SIQUEIRA, F. A. M.; PALHARINI, L. A.; SCHIAVETTO, E. C.; CANALI, A. A.; NAOUM, P. C.; MATTOS, L. C.; FETT-CONTI, A. C. Estudo de hemoglobinas anormais em doadores de sangue e recém-nascidos de São José do Rio Preto, SP. **NewsLab**, v. 41, p. 92-98, 2000.

BUNN, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 337, p. 762-769, 1997.

BUNN, H. F.; FORGET, B.G. **Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986.

BUSCH, H.; REDDY, R.; ROTHBLUM, L.; CHOI, Y. C. SnRNA's, SnRNP's and RNS processing. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 51, p. 617-654, 1982.

CABEDA, J. M.; CORREIA, C.; ESTEVINHO, A.; SIMÕES, C.; AMORIM, M. L.; PINHO, L.; JUSTIÇA, B. Unexpected pattern of β -globin mutations in β -thalassaemia patients from northern Portugal. **Br. J. Haematol.**, v. 105, n. 1, p. 68-74, 1999.

CAO, A. Phenotype-genotype relationships in mendelian disorders: the example of β -Thalassemias. **Ital. J. Pediatr.**, v. 28, n. 6, p. 440-452, 2002.

CAO, A.; GALANELLO, R. Beta-thalassemia. **Genet Med.**, v. 12, n. 2, p. 61-76, 2010.

CAO, A.; SABA, L.; GALANELLO, R.; ROSATELLI, M. C. Molecular diagnosis and carrier screening for β -thalassemia. **JAMA**, v. 278, p. 1273-1277, 1997.

CAPPELLINI, M. D.; COHEN, A.; ELEFThERIOU, A.; PORTER, J.; TAHER, A. (Eds.). **Guidelines for the clinical management of thalassemia**. 2. ed. rev. Nicosia, Cyprus: Thalassemia International Federation (TIF), 2008.

CATLIN, A. J. Thalassemia: the facts and the controversies. **Pediatr Nurs.**, v. 29, p. 447-449, 2003.

CHARNAY, P.; MELLON, P.; MANIATTIS, T. Linker scanning mutagenesis of the 5' flanking region of the mouse beta-major globin gene. Sequence requirements for transcription in erythroid cells. **Mol. Cell Biol.**, v. 5, p. 1498-1511, 1985.

CHENG, T. Post-transcriptional modification of globin RNA. **Tex. Rep. Biol. Med.**, v. 40, p. 87-100, 1980-1981.

COHEN, A. R.; GALANELLO, R.; PENNELL, D. J.; CUNNINGHAM, M. J.; VICHINSKY, E. Thalassemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program.**, p. 14-34, 2004.

CONOVER, W. J. **Practical nonparametric statistics**. 3. ed. New York: John Wiley, 1999.

COSTA, F. F.; TAVELLA, M. H.; ZAGO, M.A. Molecular basis of beta-thalassemia in Brazil. **Blood**. v. 76, n. 10, suppl 1, 1990.

COSTA, F. F.; TAVELLA, M. H.; ZAGO, M. A. β -Thalassemia Intermedia and IVS-1 NT6 Homozygosity in Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 24, p. 157-161, 1991.

CUNNINGHAM, M. J. Update on Thalassemia: clinical care and complications. **Pediatr. Clin. North Am.**, v. 55, n. 2, p. 447-460, 2008.

DARWISH, H. M.; EL-KHATIB, F. F.; AYESH, S. Spectrum of beta-globin gene mutations among thalassemia patients in the West Bank region of Palestine. **Hemoglobin**, v. 29, n. 2, p. 119-132, 2005.

DATTA, P.; BASU, S.; CHAKRAVARTY, S. B.; CHAKRAVARTY, A.; BANERJEE, D.; CHANDRA, S., CHAKRABARTI A. Enhanced oxidative cross-linking of hemoglobin E with spectrin and loss of erythrocyte membrane asymmetry in hemoglobin E beta-thalassemia. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 37, n. 2, p. 77-81, 2006.

DAVISON, A. C.; HINKLEY, D. V. **Bootstrap methods and their applications**. Cambridge : Cambridge University Press. 1997.

DE FRANCESCHI, L.; RONZONI, L.; CAPPELLINI, M. D.; CIMMINO, F.; SICILIANO, A.; ALPER, S. L., SERVEDIO, V.; POZZOBON, C.; IOLASCON, A. K-CL co-transport plays an important role in normal and beta thalassaemic erythropoiesis. **Haematologica**, v. 92, n. 10, p. 1319-1326, 2007.

DHALIWAL, G.; CORNETT, P. A.; TIERNEY, L. M. Jr. Hemolytic anemia. **Am. Fam. Physician.**, v. 69, p. 2599-2606, 2004.

DIERKS, P.; van OUYEN, A.; MANTEI, N.; WEISSMANN, C. DNA sequences preceding the rabbit beta-globin gene are required for formation in mouse L cells of beta-globin RNA with the correct 5' terminus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, n. 3, p. 1411-1419, 1981.

EFREMOV, D. G.; DIMOVSKI, A. J.; BAYSAL, E.; YE, Z.; ADEKILE, A. D.; RIBEIRO, M. L. S.; SCHILIRO, G.; ALTAY, Ç.; GÜRGEY, A.; EFREMOV, G. D.; HUISMAN, T. H. J. Possible factors influencing the haemoglobin and fetal haemoglobin levels in patients with β Talassaemia due to a Homozygosity for the IVS-I-6 (T \rightarrow C) Mutation. **Br. J. Hematol.**, v. 86, p. 824-830, 1994.

EL-LATIF, M.A.; FILON, D.; RUND, D.; OPPENHEIM, A.; KANAAN, M. The β ⁺-IVSI-6 (T \rightarrow C) mutation accounts for half of the thalassemia chromosomes in the Palestinian populations of the mountain regions. **Hemoglobin**, v. 26, n. 1, p. 33-40, 2002.

FAÀ, V.; MASALA, M.; CAO, A.; ROSATELLI, M.C. Alpha globin gene duplications in beta thalassemia patients with intact beta globin gene. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 44, p. 156-158, 2010.

FALLAH, M. S.; ALEYASIN, S. A; EBRAHIMI, A.; MAHDIAN, R.; KARIMIPOUR, M.; RAEISI, M.; JAMALI, S.; EBRAHIMI, A.; FOOLADI, P.; NADERI, M.; BAYSAL, E.; ZEINALI, S. Molecular characterization of thalassemia intermedia, due to coinheritance of

homozygous alpha triplication and IVSI-5 β -thalassemia. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 43, p. 158–160, 2009.

FISCHELL-GHODSIAN, N.; HIRSCH, P. C.; BOHLMAN, M. C. Rapid detection of the hemoglobin C mutation by allele-specific polymerase chain reaction. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 47, p.1023-1024, 1990.

FLINT, J.; HARDING, R. M.; BOYCE, A. J.; CLEGG, J. B. The population genetics of the haemoglobinopathies. **Baillière's Clin. Haematol.**, v.11, n. 1, p. 1-52, 1998.

FONSECA, S. F.; KERBAUY, J.; ESCRIVÃO, C.; FIGUEIREDO, M. S.; CANCADO, R.; ARRUDA, V. R.; SAAD, S. T. O.; COSTA, F. F. Genetic analysis of β -Thalassemia major and β -Thalassemia intermedia in Brazil. **Hemoglobin**. v. 22, n. 3, p. 197-207, 1998.

FORGET, B. G. Molecular genetics of human hemoglobin synthesis. **Ann. Inter. Med.**, v. 91, p. 605-616, 1979.

FORGET, B. G. Molecular mechanisms of β Thalassemia. In: STEINBERG, M. H.; FORGET, B. G.; HIGGS, D. R.; NAGEL, R. N. **Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management**. New York: Cambridge University, 2001. cap.12, p. 252-276.

FORMAN, D. T.; PARKER, S. L. The measurement and interpretation of serum ferritin. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, v. 10, p. 345-350, 1980.

FROSI, V. M.; MIORANZA, C. Inícios da imigração – Processos de estabelecimento. In: FROSI, V. M.; MIORANZA, C. (Eds.). **Imigração Italiana no Nordeste do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Universidade de Caxias do Sul/ Instituto Superior Brasileiro Italiano de Estudos e Pesquisas. Movimento, 1975. p. 38-42.

GALANELLO, R.; CAO, A. Relationship between genotype and phenotype. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 850, p. 325-333, 1998.

HARTEVELD, C. L.; REFALDI, C.; CASSINERIO, E.; CAPPELLINI, M. D.; GIORDANO, P. C. Segmental duplications involving the α -globin gene cluster are causing β thalassemia intermedia phenotypes in β -thalassemia heterozygous patients. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 40, p. 312-316, 2008.

HATTORI, Y. Globin gene mutation is a model of genetic abnormalities. **Rinsho Byori**, v. 47, n. 3, p. 244-251, 1999.

HENDERSON, S.; TIMBS, A.; MCCARTHY, J.; GALLIENNE, A.; VAN MOURIK, M.; MASTERS, G.; MAY, A.; KHALIL, M. S.; SCHUH, A.; OLD, J. Incidence of haemoglobinopathies in various populations – The impact of immigration. **Clin. Biochem.**, v. 42, n. 18, p. 1745-1756, 2009.

HIGGINS, J. J. **An Introduction to modern nonparametric statistics**. California: Thomson Brooks. 2004.

HO, P. J.; HALL, G. W.; LUO, L. Y.; WEATHERALL, D. J.; THEIN, S. L. β -thalassaemia intermedia: is it possible consistently to predict phenotype from genotype? **Br. J. Hematol.**, v. 100, p. 70-78, 1998.

HONIG, G. R.; ADAMS III, J. G. **Human hemoglobin genetics**. New York: Springer Verlag, 1986.

HUISMAN, T. H. J.; CARVER, M. F. H.; BAYSAL, E. **A syllabus of thalassemia mutations**. Augusta, GA: Sickle Cell Anemia Foundation, 1997.

HUISMAN, T. H. J.; MARIANNE, F. H.; CARVER, E. B.; EFREMOV, G. D. **Hb Var: a database of human hemoglobin variants and thalassemias, summaries of mutation categories**. Pennsylvania: Pennsylvania University USA/ McMaster University in Canadá, 2001.

JEFFREYS, A. J.; FLAVELL, R. A. The rabbit beta-globin gene contains a large insert in the coding sequence. **Cell**, v. 12, p. 1097-1108, 1977.

KAZAZIAN Jr., H. H. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. **Semin. Hematol.**, v. 27, n. 3, p. 209-228, 1990.

KHAN, S. N.; RIAZUDDIN, S. Molecular characterization of Beta-Thalassemia in Pakistan. **Hemoglobin**. v. 22, n. 4, p. 333-345, 1998.

KREUTZER, H. J. H. An immunological turbidimetric method of serum transferrin determination. **J. Clin. Chem. Biochem.**, v. 14, p. 401-406, 1976.

LAWN, R. M.; EFSTRATIADIS, A.; O'CONNELL, C.; MANIATIS, T. The nucleotide sequence of the human beta-globin gene. **Cell**, v. 21, p. 647-651, 1980.

LEBO, R. V.; CARRARO, A.; BURKHART-SCHLTZ, K.; DOZY, A. M.; YU, L. C.; KAN, Y. W. Assignment of human β , γ and δ globin genes to the short arm of 11 by chromosome sorting and DNA restriction enzyme analysis. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 5804-5808, 1979.

LERMEN, L.; OSTERNACK, B. R.; GONÇALVES, S.; SILVA, P. H.; HAAS, P. Talassemia beta minor: estudo de caso e revisão da literatura. **Estud. Biol.**, n. 29, v.67/69, p.329-334, 2007.

LEWIS, S. M.; BAIN, B. J. **Hematologia prática de Dacie e Lewis**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

LIBANI, I. V.; GUY, E. C.; MELCHIORI, L.; SCHIRO, R.; RAMOS, P.; BRENDA, L.; SCHOLZEN, T.; CHADBURN, A.; LIU, Y.; KERNBACH, M.; BARON-LÜHR, B.; POROTTO, M.; DE SOUSA, M.; RACHMILEWITZ, E. A.; HOOD, J. D.; CAPPELLINI, M. D.; GIARDINA, P. J.; GRADY, R. W.; GERDES, J.; RIVELLA, S. Decreased differentiation of erythroid cells exacerbates ineffective erythropoiesis in β thalassemia. **Blood**, v. 113, n. 3, p. 875-885, 2008.

MACKA, A. K.; KATO, G. J. Sick cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 38, n. 8, p. 1237-1243, 2006.
MAHAJAN, M. C.; WEISSMAN, S. M. Multi-protein complexes at the beta-globin locus. **Brief Funct. Genomic Proteomic.**, v. 5, n. 1, p. 62-65, 2006.

MAGGIO, A.; CARONIA, F.; RUSSO, G. **Clinica e terapia della talassemia**. Limena: Libreria Universitaria, 2000. cap. 3, p. 61-94, 2000.

MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. **J. Clin. Pathol.**, v. 18, p. 90-192, 1965.

MODELL, B.; DARLISON, M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. **Bull. World Health Org.**, v. 86, n. 6, p. 417-496, 2008.

MORENO, I.; BOLUFER, G. P.; PEREZ, S. M. The molecular changes in thalassemias in Spain. A review of existing studies. **Med. Clín.**, v. 113, n. 20, p. 789-794, 1999.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed reaction. **Methods Enzymol.**, v. 155, p. 335-345, 1987.

NAGEL, R. L.; STEINBERG, M. H. Genetics of β^S gene: origins, genetic, epidemiology, and epistasis in sickle cell anemia. In: STEINBERG, M. H.; FORGET, B. G.; HIGGS, D. R.; NAGEL, R. (Eds.). **Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management**. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. p. 711-755.

NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997.

_____. **Eletroforese, técnicas e diagnósticos**. 2. ed. São Paulo: Santos, 1999.

NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A. **Doença das células falciformes**. São Paulo: Sarvier, 2004.

OLD, J. M. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. **Blood Rev.**, v. 17, n. 1, p. 43-53, 2003.

OLIVEIRA, J. C. **História do Ceará**. 3. ed. São Paulo: Editora do Brasil, 1982.

PANIGRAHI, I.; AGARWAL, S.; PRADHAN, M.; CHOUDHRY, D.R.; SAXENA, R. Molecular characterization of thalassemia intermedia in Indians. **Haematologica**, v. 91, p. 1279-1280, 2006.

POMPEU, G. V. M.; TASSIGNY, M. M. **História da nossa gente**. Fortaleza: INESP, 2004.

PREMAWARDHENA, A.; FISHER, C. A.; FATHIU, F.; DE SILVA, S.; PERERA, W.; PETO, T. E. A.; OLIVIERI, N. F.; WEATHERALL, D. J. Genetic determinants of Jaundice and Gallstones in Haemoglobin E β Thalassemia. **Lancet**. v. 357, p. 1945-1946, 2001.

QATANANI, M.; TAHER, A.; KOUSSA, S.; NAAMAN, R.; FISHER, C.; RUGLESS, M.; OLD, J.; ZAHED, L. β -Thalassaemia Intermedia in Lebanon. **Eur. J. Haematol.**, v. 64, p. 237-244, 2000.

RAHIM, F. Microcytic hypochromic anemia patients with thalassemia: genotyping approach. **Indian J. Med. Sci.**, v. 63, n. 3, p. 101-107, 2009.

RAHIMI, Z.; MUNIZ, A.; PARSIAN, A. Detection of responsible mutations for beta thalassemia in the Kermanshah Province of Iran using PCR-based techniques. **Mol. Biol. Rep.**, v. 37, p. 149-154, 2010.

RAMALHO, A. S. Investigação genético-epidemiológica das talassemias beta e delta-beta no Estado de São Paulo. **Rev. Paul. Med.**, v. 88, p. 68, 1976.

RAMALHO, A. S.; SILVA, R. B. P.; TEIXEIRA, R. C.; COMPRI, M. B. Hemoglobin screening: response of a Brazilian community to optional programs. **Cad. Saúde Pública.**, v. 15, p. 591-595, 1999.

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

REICHERT, V. C. D.; de CASTRO, S. M.; WAGNER, S. C.; de ALBUQUERQUE, D. M.; HUTZ, M. H.; LEISTNER-SEGAL, S. Identification of β thalassemia mutations in South Brazilians. **Ann. Hematol.**, v. 87, n. 5, p. 381-384, 2008.

RIBEIRO, D. M.; ZACCARIOTTO, T. R.; SANTOS, M. N.; COSTA, F. F.; SONATI, M. F. Influence of the polymorphisms of the alpha-major regulatory element HS-40 on in vitro gene expression. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, n. 9, p. 783-796, 2009.

RIVELLA, S. Ineffective erythropoiesis and thalassemias. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 16, p. 187-194, 2009.

ROLDAN, A.; GUTIERRES, M.; CYGLER, A.; BONDUEL, M.; SCIUCCATI, G.; TORRES, A. F. Molecular Characterization of β -Thalassemia Genes in an Argentine Population. **Am. J. Hematol.**, v. 54, p. 179-182, 1997.

RUND, D.; ORON-KARNI, V.; FILON, D.; GOLDFARB, A.; RACHMILEWITZ, E.; OPPENHEIM, A. Genetic analysis of β -Thalassemia Intermedia in Israel: diversity of mechanisms and unpredictability of phenotype. **Am. J. Hematol.**, v. 54, p. 16-22, 1997.

RUND, D.; RACHMILEWITZ, E. Beta-Thalassemia. **N Engl. J. Med.**, v. 353, p. 1135-1146, 2005.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2. ed. New York: Cold Spring Harbor, 1992.

SCHECHTER, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3927-3938, 2008.

SHAFER, W. G.; HINE, M. K.; LEVY, B. M. **Tratado de patologia bucal**. 41. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1987.

SIEDEL, J.; WAHLEFELD, A. W.; ZIEGENHORN, J. A new iron ferro zinc- reagent without desproteinization. **Clin. Chem.**, v. 30, p. 975, 1984.

SOLLAINO, M. C.; PAGLIETTI, M. E.; PERSEU, L.; GIAGU, N.; LOI, D.; GALANELLO, R. Association of α globin gene quadruplication and heterozygous β thalassemia in patients with thalassemia intermedia. **Haematologica**, v. 94, n. 10, p. 1445-1448, 2009.

SONATI, M. F.; COSTA, F. F. Genética das doenças hematológicas. **J. Pediatr.**, v. 84, p. S40-S51, 2008.

SOUSA, S.; GONÇALVES, D.; CORDEIRO, C., *et al.* Uma nova história do Ceará. 3. ed. Fortaleza: Edições Demócrito Rocha, 2004.

STAMATOYANNOPOULOS, G. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. **Exp. Hematol.**, v. 33, p. 259-271, 2005.

TAMAGNINI, G. P.; LOPES, M. C.; CASTANHEIRA, M. E.; WAINSCOAT, J. S. β thalassaemia – Portuguese type: clinical, haematological and molecular studies of a newly defined form of β thalassaemia. **Br. J. Haematol.**, v. 54, p. 189-200, 1983.

TANNO, T.; BHANU, N. V.; ONEAL, P. A.; GOH, S. H.; STAKER, P.; LEE, Y. T.; MORONEY, J. W.; REED, C. H.; LUBAN, N. L.; WANG, R. H.; ELING, T. E.; CHILDS, GANZ, T.; LEITMAN, S. F.; FUCHAROEN, S.; MILLER, J. L. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. **Nat. Med.**, v. 13, n. 9, p. 1096-1101, 2007.

THEIN, S. L. β -Thalassaemia. **Baillière Clin. Haematol.**, v.11, n. 1, p. 91-126, 1998.

_____. Genetic modifiers of β -thalassemia. **Haematologica**, v. 90, n. 5, p. 649-660, 2005.

THOMPSON, M. W.; McINENES, R. R.; WILLARD, H. F. **Thompson genética médica**. 5. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1993.

TORRES, F. R.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Hemoglobinas humanas-hipótese malária ou efeito materno? **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.27, n. 1, p. 53-60, 2005.

TOUMBA, M.; SERGIS, A.; KANARIS, C.; SKORDIS, N. Endocrine complications in patients with Thalassaemia Major. **Pediatr. Endocrinol. Rev.**, v. 5, p. 642-648, 2007.

TRAEGER-SYNODINOS, J.; KANAVAKIS, E.; VRETTOU, C.; MARAGOUDAKI, E.; MICHAEL, T.; METAXOTOU-MAVROMATI, A.; KATTAMIS, C. The triplicated alphas-globin gene locus in beta-thalassaemia heterozygotes: clinical, haematological, biosynthetic and molecular studies. **Br. J. Haematol.**, v. 97, n. 2, p. 506-507, 1997.

TREISMAN, R.; ORKIN, S. H.; MANIATIS, T. Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned β thalassaemia genes. **Nature**, v. 302, p. 591-596, 1983.

TUZMEN, S.; SCHECHTER, A.N. Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic methods for elucidating β -thalassemia mutations. **Blood Rev.**, v.15, p.19-29, 2001.

URBINATI, F.; MADIGAN, C.; MALIK, P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part II: thalassaemias. **Expert Rev. Mol. Med.**, v. 8, p. 1-26, 2006.
VARAWALLA, N.Y.; OLD, J.M.; SARKAR, R.; VENKATESAN, R.; WEATHERALL, D.J. The Spectrum of β -Thalassaemia mutations on the Indian subcontinent: basis for prenatal diagnosis. **Br. J. Haematol.**, v. 78, p. 242-247, 1991.

WATANABE, A. M. **Prevalência da anemia falciforme no estado do Paraná**. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) - Departamento de Clínica Médica, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

WAYE, J. S.; ENG, B.; PATTERSON, M.; WASI, P.; CHUI, D. H. K.; FRANCOMBE, W. H.; SHER, G. D.; OLIVIERI, N. F. Severity of β -Thalassemia due to genotypes involving the IVS-I-6 (T→C) Mutation. **Am. J. Hematol.**, v. 50, p. 15-19, 1995.

WEATHERALL, D. J. The Thalassaemias. **Br. Med. J.**, v. 314, p. 1675-1678, 1997.

_____. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. **Nat. Rev.**, v. 2, p. 45-55, 2001.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. **The Thalassaemia syndromes**. 3th ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1981.

_____. **The Thalassaemia syndromes**. 4. ed. Oxford: Blackwell Science; 2001.

WEATHERALL, D. J.; PROVAN, A. B. Red cells I: inherited anaemias. **Lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1169-1175, 2000.

WEATHERALL, D. J.; WAINSCOAT, J. S. The molecular pathology of thalassemia. In: HOFFBRAND, A.V. **Recent advances in haematology**. Oxford: Churchill Livingstone, 1985. p. 63-88.

WEATHERALL, D. J. Disorders of globin synthesis: The Thalassemias. In: WILLIAMS, W. J.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A. J.; RUNDLES, R. W. **Hematology**. 7th ed. New York: McGraw Hill, 2006.

WEIZER-STERN, O.; ADAMSKY, K.; AMARIGLIO, N.; LEVIN, C.; KOREN, A.; BREUER, W.; RACHMILEWITZ, E.; BREDA, L.; RIVELLA, S.; CABANTCHIK, Z. I.; RECHAVI, G. Downregulation of hepcidin and haemojuvelin expression in the hepatocyte cell-line HepG2 induced by thalassaemic sera. **Br. J. Haematol.**, v.135, n. 1, p. 129-138, 2006.

ZAGO, M. A. Hemoglobinopatias: prevalência e variabilidade. **Rev. Paul. Med.**, v. 104, n. 6, p. 300-304, 1986.

_____. Talassemias. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 31, p. 309-328.

ZAGO, M. A.; COSTA, F. F.; TONE, L. G.; BOTTURA, C. Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population. **Hum. Hered.**, v. 33, n. 2, p. 125-129, 1983.

ZAMARO, P. J. A.; CANALLI, A. A.; SILVA JUNIOR, W. A.; DOMINGOS, C. R. B. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinas semelhantes à HbS. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 38, n. 4, p. 261-266, 2002.

ANEXOS

ANEXO A**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E
ENFERMAGEM (FFOE)****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA**

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa intitulada como “Caracterização clínica, hematológica e molecular dos pacientes com β talassemia em Fortaleza, Ceará”, que tem como objetivo principal traçar o perfil clínico, hematológico, e molecular desses pacientes.

Convido o Sr (a) a participar da pesquisa, em caso de dúvida, poderá comunicar-se com a pesquisadora Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves, que reside na rua Pereira Valente, 640, Apto 701, bairro Meireles, Fortaleza, CE. Fone: (0xx85)-33668264. Para tanto, necessitamos que o senhor (a) autorizasse a obtenção da coleta de sangue e das informações para que seja realizada a pesquisa. A coleta de sangue será realizada nos Hemocentros do Estado do Ceará, localizado na Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Rodolfo Teófilo.

A participação do senhor (a) na pesquisa será plenamente voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material, sendo que, ao participar da pesquisa, não ficará exposto (a) a nenhum risco, podendo desistir de participar, a qualquer momento, sem prejuízo de sua assistência médica. Sua identidade será mantida em sigilo absoluto, sendo a divulgação dos resultados totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão acadêmica de âmbito científico e, ainda assim, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes. Será, no entanto, permitido o acesso às informações sobre procedimentos relacionados à pesquisa.

Esse documento será impresso em duas vias, ficando uma com a entrevistada e a outra com a pesquisadora.

Certo e ciente dos detalhes acima descritos, e, por concordar na íntegra com todos os termos acima expostos, manifestos, por vontades próprias, livres e conscientes, o propósito de participar do presente estudo.

Fortaleza, ____ de _____ de _____.

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura de quem obteve o termo

ANEXO B

Valores de referências dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e níveis de Hb F e Hb A₂ utilizados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Walter Cantídeo.

Parâmetros	Valor de referência
Hemácias (milhões/mm³)	3.800.000 a 5.200.000
Hemoglobina (g/dL)	12,0 a 16,0
Hematócrito (%)	35, 0 a 47,0
VCM (fL)	80, 0 a 100,0
HCM (pg)	26,0 a 34,0
CHCM (g/dL)	32,0 a 36,0
Leucócitos (/mm³)	4.000 a 11.000
Plaquetas (/mm³)	140.000 a 450.000
Ferritina (ng/mL)	20 a 200
CTLFe (µg/dL)	250 a 410
CLLFe (µg/dL)	140 a 280
Ferro sérico (µg/dL)	35 a 150
IST (%)	20 a 50
Hb F (%)	até 2,0
Hb A₂ (%)	2,5 a 3,5

APÊNDICE

APÊNDICE A
FICHA CLÍNICA

Prontuário _____ Data: ____/____/____
 Nome completo: _____ Sexo: () fem () masc
 Endereço: _____
 Cidade onde mora: _____ Telefone: (____) _____
 Idade: ____ Data de nasc: ____/____/____ Local de nasc _____
 Profissão atual: _____ Etnia: () branco () negro () pardo
 Procedência: () capital (CE) () interior (CE) _____

Dados laboratoriais ao diagnóstico

Hemograma

Hemácias (milhões/mm³): _____
 Hb (g/dL): _____
 Ht (%): _____
 VCM (fL): _____
 HCM (pg): _____
 CHCM (g/dL): _____
 Leucócitos (/mm³): _____
 Plaquetas (/mm³): _____

Perfil do ferro

Ferritina (ng/mL): _____
 CTLFe (µg/dL): _____
 CPLFe (µg/dL): _____
 Ferro (µg/dL): _____
 IST (%): _____

Perfil eletroforético

HbF (%): _____ HbA₂ (%): _____

Dados clínicos

Fenótipo () β menor () β intermediária

Esplenomegalia	() sim	() não
Hepatomegalia	() sim	() não
Cefaleia	() sim	() não
Fadiga	() sim	() não
Tontura	() sim	() não
Sonolência	() sim	() não
Icterícia	() sim	() não
Úlcera de pernas	() sim	() não
Alterações esqueléticas	() sim	() não
Adinamia	() sim	() não
Constipação	() sim	() não
Gastrite	() sim	() não
Edema MMII	() sim	() não