

LUCIANE CRISTINA BERTHOLO

***AMPLIFICAÇÃO GÊNICA ALELO ESPECÍFICA E
MULTIPLEX NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE
HEMOGLOBINAS ANORMAIS***

ARARAQUARA

2005

LUCIANE CRISTINA BERTHOLO

***AMPLIFICAÇÃO GÊNICA ALELO ESPECÍFICA E
MULTIPLEX NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE
HEMOGLOBINAS ANORMAIS***

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP para obtenção do Grau de Doutora em Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. HAROLDO WILSON MOREIRA

ARARAQUARA

2005

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Haroldo Wilson Moreira

(Orientador)

Prof. Dr. Ivan de Lucena Angulo

(Membro Titular)

Profa. Dra. Ana Maria de Souza

(Membro Titular)

Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

(Membro Titular)

Prof. Dr. Amauri Antiquera Leite

(Membro Titular)

Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos

(Membro Suplente)

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara

(Membro Suplente)

Prof. Dr. Paulo César Naoum

(Membro Suplente)

*No universo,
não existem conquistadores eternos.
O sol nos proporciona dias longos e curtos,
e a lua tem fases crescentes e minguantes.
Sun Tzu (6.26)*

AGRADECIMENTOS

Agradecer é necessário sempre que pessoas nos fazem evoluir de alguma maneira, seja como profissional ou como ser humano.

Ao meu marido, agradeço por ter compreendido as inúmeras vezes de minha ausência, sempre me incentivando e nunca me deixando desanimar. Agradeço mais ainda, pois grande parte deste trabalho contou com sua ajuda.

A minha família, pelo apoio e incentivo. Muito obrigada.

*Ao Prof. Haroldo Wilson Moreira
Pela oportunidade de tê-lo como orientador, pela dedicação e amizade.*

"Uns são homens, alguns são professores; poucos são mestres. Aos primeiros escuta - se; aos segundos, respeita - se e aos terceiros, segue - se." Com muito carisma, meu obrigada.

Agradeço aos membros da comissão examinadora pela ajuda, disponibilidade e sugestões na realização deste trabalho.

A amiga Débora pelo apoio e incentivo dedicados nesta etapa.

A Fundação para o desenvolvimento da Unesp - FUNDUNESP, pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento da pesquisa.

A seção de Pós-Graduação da FCF - UNESP pela orientação sempre constante.

A todos,

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

Resumo em português	08
Resumo em inglês	10
Lista de figuras	12
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	14
INTRODUÇÃO	15
1. Bases moleculares das hemoglobinas variantes e talassemias.....	15
2. Métodos diagnósticos para análise de DNA.....	21
3. Hemoglobinas variantes, talassemias e interações observadas na população brasileira	24
Hemoglobina S, C e interações	26
Hemoglobina D e interações	27
Talassemias do tipo beta e interações	27
Hb Lepore	29
Talassemias do tipo alfa	29
Hemoglobina Constant Spring	31
OBJETIVOS	32
CASUÍSTICA E METODOLOGIA	33
1.Casuística	33
2.Metodologia	34
2.1 Extração e quantificação do DNA genômico.....	34
2.2 Amplificação do DNA genômico.....	34
2.3 Identificação dos genótipos AA, AS, SS, AC, CC e SC	35
2.4 Identificação dos genótipos AA, AD E DD	37
2.5 Identificação do genótipo SD	38
2.6 Identificação dos genótipos IVS I-6 e IVS I-110	39
2.7 Identificação dos genótipos IVS I-1 e CD 39	41
2.8 Identificação dos genótipos C/ β^+ talassemia e S/ β^+ talassemia	42
2.9 Identificação do genótipo Lepore	44
2.10 Identificação dos genótipos de talassemia alfa	47
2.11 Identificação dos genótipos Constant Spring	49
2.12 Seqüências nucleotídicas dos primers utilizados nas reações em	

cadeia da polimerase	50
RESULTADOS	53
DISCUSSÃO	63
CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

RESUMO

As hemoglobinopatias constituem um grupo de alterações hereditárias prevalentes em muitas regiões do mundo, atingindo a população brasileira de forma significativa; sendo decorrentes de alterações em genes estruturais, responsáveis pelo aparecimento das hemoglobinas variantes ou em genes reguladores, resultando as talassemias.

Essas patologias têm sido identificadas na maioria das vezes por procedimentos eletroforéticos, sendo que nossa experiência laboratorial evidencia que os mesmos nem sempre apresentam a resolução suficiente para a correta caracterização, confirmação da mutação e o estabelecimento de um protocolo de acompanhamento dos portadores.

Sendo assim, foram propósitos do presente trabalho estabelecer metodologia laboratorial embasada em estudo molecular que possibilite o auxílio diagnóstico de hemoglobinas anormais observadas na população brasileira e sem caracterização completa ou pouco informativa; utilizar *primers* que se acoplem exatamente na posição da mutação do alelo mutante e na respectiva posição do alelo normal, com possibilidade da realização de amplificação gênica alelo específica e com esses conhecimentos, estabelecer protocolos de aplicação laboratorial para uso na rotina.

As amostras de estudo foram constituídas por 20 modelos de mutações pertencentes a portadores das mesmas e que inicialmente apresentavam alterações em seu perfil eletroforético, sendo coletadas ou do próprio sujeito da pesquisa ou obtidas de banco de amostras.

Os indivíduos eram de ambos os sexos, com diferentes idades e características raciais (caucasóides e não caucasóides) e pertencentes às diversas classes econômicas.

Foi nossa pretensão incluímos no presente estudo um número significativo de amostras relacionadas a fenótipos diferentes de hemoglobinas e da maioria das mutações observadas na população brasileira, sendo que conseguimos analisar por amplificação gênica alelo específica e multiplex as seguintes mutações: Hemoglobinas variantes com alteração de um nucleotídeo: Hb SS/Hb AS/Hb CC/Hb AC/Hb AD/ Hb DD.

Talassemias do tipo beta: β^0 talassemia / β^+ talassemia / Hb Lepore.

Interações entre hemoglobinas variantes: Hb SC / Hb SD.

Interações entre hemoglobinas variantes e talassemia do tipo beta: Hb S β^+ talassemia/ Hb C β^+ talassemia.

Talasseмии do tipo alfa: α^0 talassemia/ α^+ talassemia/ Hb Constant Spring.

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total através do método de Miller et al. (1988) modificado. A amplificação do material genético para a identificação dos genótipos de anemia e traço falciforme e hemoglobina C, de talassemias beta codon 39, IVS I-110, IVS I-1e IVS I-6 e Hb D em homozigose, heterozigose e interações e Hb Constant Spring, foi realizada pela técnica de amplificação gênica alelo específica (PCR-AE) e a identificação da interação HbS/HbD, Hb Lepore e talassemias alfa por PCR multiplex em um único tubo.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador MiniCycler™ da MJ Research, conforme algoritmo estabelecido para o equipamento e na dependência do fragmento de DNA à amplificar e das Tm dos primers utilizados.

Os resultados obtidos permitem concluir que foi possível padronizar um teste diagnóstico, baseado na amplificação gênica alelo específica (PCR-AE) e na amplificação gênica multiplex (PCR-Multiplex). A aplicabilidade dessas metodologias proporcionou confiabilidade na interpretação dos resultados, sendo de fácil execução e com custo de uma reação de PCR-AE 25% inferior em relação a técnica de PCR com uso de enzima de restrição, podendo fornecer um diagnóstico laboratorial em curto espaço de tempo. As metodologias ou associações dos conhecimentos adquiridos possibilitou a identificação de estados homozigotos, heterozigotos e interações e o estabelecimento de protocolos próprios para a identificação de hemoglobinopatias que acometem nossa população foi possível, podendo ser utilizados na rotina laboratorial.

Palavras-chave: hemoglobinopatias, amplificação gênica alelo específica e multiplex.

ABSTRACT

The hemoglobinopathies are a group of hereditary hemoglobin disorders with worldwide distribution, meeting Brazilian population significantly; being decurrent from structural genes alterations, responsible for hemoglobin variants or in regulatory genes, results the thalassemia.

These disorders have been identified in most cases by electrophoretics procedures, and our laboratory experience evidences that sometimes are not obtained enough resolution to a right characterization, confirmation of mutation and the establishment of a protocol to keep the carriers attendance.

As per discussion above, the objectives of this study were to establish a laboratory methodology based on a molecular method that helps the abnormal hemoglobins diagnostic observed on Brazilian population and without a complete characterization or low informative; to use in parallel two primers that differ at their 3' extremity and are complementary to the normal or mutated sequences, with possibility of doing allele-specific amplification and with this knowledge, to establish protocols of laboratory application to be used in the routine.

The samples of the study were based on 20 mutation models belonging to carriers and that initially presented alterations in their electrophoretic profile, being collected from the own researchers or obtained from sample banks.

The individuals were from both sex, with different ages and racial characteristics (Caucasoid and non Caucasoid) and from different economic levels.

It was our objective to include in the study, as much as possible, samples related to different phenotypes of hemoglobins and with the most number of mutations observed on Brazilian population, and we got to analyze by multiplex and allele-specific enzymatic amplification the followed mutations:

Hemoglobin variants with alteration of one nucleotide: Hb SS/Hb AS/Hb CC/Hb AC/Hb AD/ Hb DD.

Beta thalassemia: β^0 thalassemia / β^+ thalassemia / Hb Lepore.

Interaction between hemoglobin variants: Hb SC / Hb SD.

Interaction between hemoglobin variants and beta thalassemia: Hb S β^+ thalassemia/ Hb C β^+ thalassemia.

Alpha thalassemia: α^0 thalassemia/ α^+ thalassemia/ Hb Constant Spring.

The genomic DNA was isolated from whole blood through Miller et al. (1988) modified method. It was used the allele-specific amplification for the identification of Hb S and Hb C, of Beta thalassemia codon 39, IVS I-110, IVS I-1, IVS I-6 and Hb D in homozygous, heterozygous and interactions and Hb Constant Spring, and single-tube multiplex polymerase chain reaction for the identification of interaction HbS/HbD, Hb Lepore and alpha thalassemia.

The reactions of amplification were run in a DNA thermal MiniCycler™ (MJ Research), according to established algorithm of equipment and depending on DNA fragment to amplify and on T_m of used primers.

The results permit us to conclude that it was possible to standardize a diagnostic test, based on allele-specific amplification (PCR-AE) and multiplex PCR assay. The applicability of these methodologies give us confidence on results interpretation, and it is easy of execution, and with cost around 25% less of methods that uses restriction enzyme analysis, and can offer us a laboratory diagnostic in a short time. The methodologies or association of obtained knowledge gave us the possibility to identify homozygous, heterozygous and interactions, and was possible to establish specific protocols to identify hemoglobinopathies that attacks our population, and can be used on laboratorial routines.

Key-words: hemoglobinopathies, multiplex and allele-specific amplification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação dos genes dos agrupamentos beta e alfa	16
Figura 2: Seqüência parcial do gene da globina beta humana	36
Figura 3: Representação esquemática da localização dos <i>primers</i> no gene da globina beta humana na caracterização molecular das hemoglobinas S, C e interações	36
Figura 4: Seqüência parcial do gene da globina beta humana	37
Figura 5: Representação esquemática da localização dos <i>primers</i> no gene da globina beta humana na caracterização molecular da hemoglobina D	38
Figura 6: Seqüência parcial do gene da globina beta humana	39
Figura 7: Representação esquemática da localização dos <i>primers</i> no gene da globina beta humana na caracterização molecular da interação SD	39
Figura 8: Seqüência parcial do gene da globina beta humana	40
Figura 9: Representação esquemática da localização dos <i>primers</i> no gene da globina beta humana na caracterização molecular de talassemia beta IVS I-6 e IVS I-110	41
Figura 10: Seqüência parcial do gene da globina beta humana	42
Figura 11: Representação esquemática da localização dos <i>primers</i> no gene da globina beta humana na caracterização molecular de talassemia beta IVS I-1 e CD 39	42
Figura 12: Seqüência parcial do gene da globina beta humana	43
Figura 13: Representação esquemática da localização dos <i>primers</i> no gene da globina beta humana na caracterização molecular da interação C/ β^+ talassemia e S/ β^+ talassemia	44
Figura 14: Seqüência parcial do gene da globina beta humana	45
Figura 15: Seqüência parcial do gene híbrido da globina delta e beta humana	46
Figura 16: Representação esquemática da localização dos <i>primers</i> no gene da globina delta e beta humana na caracterização molecular da hemoglobina Lepore	46

Figura 17: Representação esquemática da localização dos <i>primers</i> na fusão dos genes das globinas delta e beta humana na caracterização molecular da hemoglobina Lepore	47
Figura 18: Seqüência parcial dos genes das globinas alfa 2 e alfa 1 humana	48
Figura 19: Representação esquemática da localização dos <i>primers</i> utilizados na caracterização molecular de alterações no gene da globina alfa humana	49
Figura 20: Seqüência parcial do gene da globina alfa 2 humana	50
Figura 21: Representação esquemática da localização dos <i>primers</i> utilizados na caracterização molecular de Constant Spring	50
Figura 22: <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR-AE e multiplex para determinação de mutações nos genes das globinas beta e delta humana	51
Figura 23: <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR-AE e multiplex para determinação de mutações no gene da globina alfa humana	52
Figura 24: PCR alelo específica para identificação dos genótipos AA, SS, AS e SC	54
Figura 25: PCR alelo específica para identificação dos genótipos AA, CC, AC e SC	54
Figura 26: PCR alelo específica para identificação dos genótipos AA, AD e DD	55
Figura 27: PCR multiplex para identificação do genótipo SD	56
Figura 28: PCR alelo específica para identificação dos genótipos IVS I-110	57
Figura 29: PCR alelo específica para identificação do genótipo CD 39	57
Figura 30: PCR alelo específica para identificação do genótipo IVS1-6	58
Figura 31: PCR alelo específica para identificação do genótipo IVS1-1.....	58
Figura 32: PCR alelo específica para identificação do genótipo C/ β^+ talassemia e S/ β^+ talassemia	59
Figura 33: PCR multiplex para identificação do genótipo Lepore	60
Figura 34: PCR multiplex para identificação do genótipo alfa	61
Figura 35: PCR-AE para identificação do genótipo Constant Spring	62

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Hb = hemoglobina

α = alfa

β = beta

Kb = Kilobases

Intervening Sequence (IVS) = introns

γ^G = gama glicina

γ^A = gama alanina

RNA_m = ácido ribonucleico mensageiro

DNase = desoxiribonuclease

DNA = ácido desoxiribonucleico

GATA-1 = fator de transcrição

NF-E2 = fator de transcrição

EKLF-1 = fator de transcrição

CAP = 7 - metil-guanosina-trifosfato

GT = sítio doador de excisão

AG = sítio aceitador de excisão

G+C = guanina + citosina

β^0 = beta zero

β^+ = beta mais

α^0 = alfa zero

α^+ = alfa mais

$\alpha^{3.7}$ = deleção de 3,7 Kb

$\alpha^{4.2}$ = deleção de 4,2 Kb

RFLP = polimorfismo de fragmento de restrição

PCR = reação em cadeia da polimerase

ASO = oligonucleotídio alelo específico

T_m = temperatura de *melting*

ARMS = sistema de mutação de amplificação refratária

EDTA = ácido etileno diamino tetracético

DMSO = dimetil sulfóxido de sódio

BSA = albumina sérica bovina

DGGE = eletroforese em gel gradiente desnaturante

PHHF = persistência hereditária de hemoglobina fetal

INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias constituem um grupo de alterações hereditárias prevalentes em muitas regiões do mundo, atingindo a população brasileira de forma significativa, sendo decorrentes de alterações em genes estruturais, responsáveis pelo aparecimento das hemoglobinas variantes ou em genes reguladores, resultando nas talassemias.

A identificação dessas patologias tem sido realizada por procedimentos eletroforéticos e outros, sendo que nossa experiência laboratorial evidencia que os mesmos nem sempre apresentam a resolução suficiente para a correta caracterização, confirmação da mutação e o estabelecimento de um protocolo de acompanhamento dos portadores. Esse fato poderia ser sanado pela aplicação de metodologia molecular que permita, de forma segura e acertada, caracterizar o tipo de mutação responsável pela patologia.

1. Bases moleculares das hemoglobinas variantes e talassemias

Os arranjos tetraméricos das cadeias polipeptídicas que constituem as hemoglobinas humanas estão na dependência de genes estruturais, responsáveis pela natureza dos aminoácidos e por genes reguladores, responsáveis pelo conteúdo quantitativo das cadeias formadas. Duas dessas são constituídas por 141 aminoácidos, denominadas de cadeias tipo alfa e as outras duas cadeias, as do tipo beta, possuem uma seqüência de 146 aminoácidos. Os genes pertencentes às determinadas famílias são expressos de acordo com rigoroso e coordenado programa ontogenético, sendo que o controle da expressão gênica implica mecanismos regulatórios complexos (Lehmann; Huntsman, 1974; Peri et al., 1998).

As cadeias do tipo alfa são sintetizadas por genes específicos duplicados localizados na região sub telomérica do cromossomo 16 em uma região de aproximadamente 30 Kb, na posição p12-pter e na seqüência 5' - ζ - $\psi\zeta$ - $\psi\alpha_2$ - $\psi\alpha_1$ - α_2 - α_1 - θ_1 - 3' (zeta – pseudo zeta – pseudo alfa 2 – pseudo alfa 1 – alfa 2 – alfa 1 – teta 1). No complexo gênico alfa os dois genes funcionais, alfa 1 e alfa 2, expressam a síntese da globina alfa, permanecendo praticamente em atividade durante toda vida do indivíduo, com exceção dos primeiros meses de vida intra-útero. A cadeia zeta expressa-se no embrião, sendo codificada pelo gene zeta. O

gene teta 1 foi também identificado em 3' do complexo alfa e observado em primatas superiores, em coelhos e em cavalos, sendo que a transcrição desse gene foi encontrada em células eritróides de fetos humanos (Barg et al., 1982; Barton et al., 1982; Hsu et al., 1988; Kaplan; Delpech, 1990; Jones; Poon, 2002; Stamatoyannopoulos, 2005) (Figura 1).

Os genes das cadeias tipo beta estão localizados no braço curto do cromossomo 11, na posição p13-pter, formando um grupo com tamanho aproximado de 60 Kb e na seqüência 5' - ϵ - γ^G - γ^A - $\psi\beta_1$ - δ - β - 3' (épsilon – gama glicina – gama alanina – pseudo beta um – delta – beta). Com exceção dos pseudogenes, os caracterizados por ψ , os demais *loci* apresentam seqüências de bases cujos exons são responsáveis pela produção de cadeias polipeptídicas que recebem o nome do gene que lhe originou. Os pseudogenes possuem seqüências 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; Stamatoyannopoulos, 2005) (Figura 1).

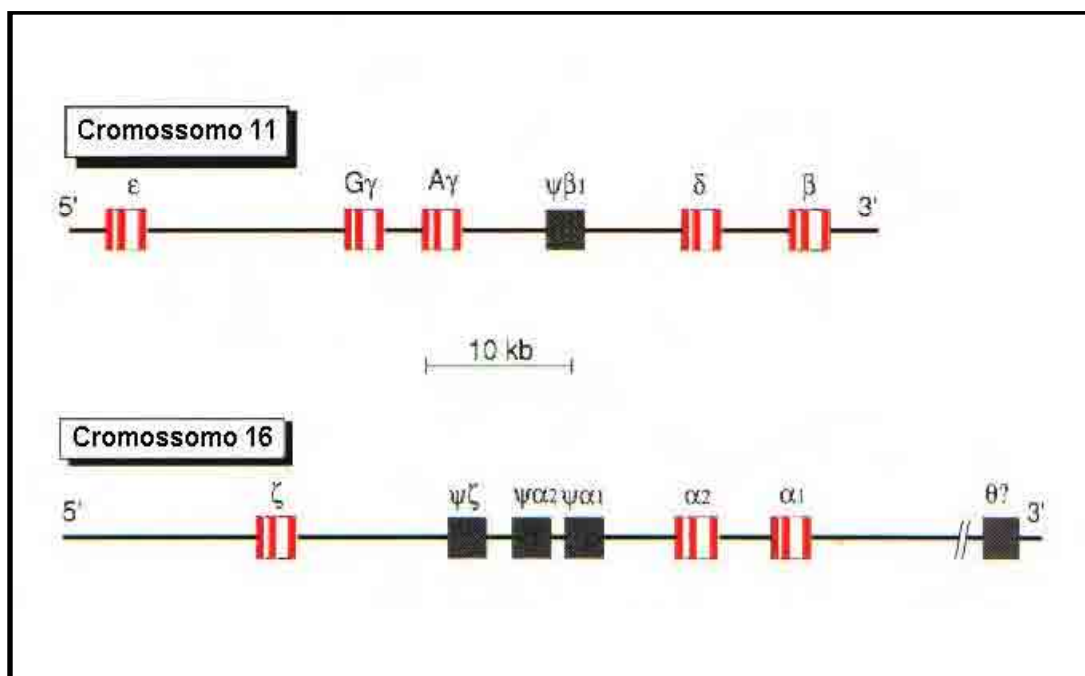


Figura 1: Representação dos genes dos agrupamentos beta e alfa.

Foto adaptada: KAPLAN, J.C.; DELPECH, M. **Biologie moléculaire et médecine**. 2.ed. Paris: Flammarion Médecine Sciences, 1990. 610p.

Esses genes apresentam estruturas semelhantes, onde três regiões codificadoras dos mesmos (os exons) são interrompidas por outras duas constituídas de seqüências que não se expressam em produto protéico (os íntrons = IVS = Intervening Sequence). Nos genes do grupo beta, as seqüências são interrompidas entre os codons 30 e 31 e entre os codons 104 e 105, enquanto que no grupo da globina alfa, entre os codons 31 e 32 e codons 99 e 100 (Jeffreys; Flavell, 1977; Lawn et al., 1980).

No agrupamento alfa, os dois genes alfa estão distantes por 4 Kilobases, sendo que mais de 20 Kilobases separam os genes zeta e alfa. Por sua vez, no agrupamento beta os genes delta e beta estão separados por 5 a 6 Kilobases e o complexo delta/beta por 15 a 18 Kilobases do complexo γ^G / γ^A (Bunn; Forget, 1986).

Os genes da globina humana são transcritos nas células eritróides, sendo essa transcrição estabelecida pelas seqüências de bases contidas nos exons e íntrons que sofrem modificações nas extremidades 3' e 5', até ser estabelecida a forma de RNAm funcional. Como parte destas modificações tem o processo de *splicing*, que ocorre com a retirada dos íntrons e a união dos exons, formação de um capuz metilado na extremidade 5' por adição de um ácido guanílico metilado e formação da cauda poli-A em 3', adicionando-se uma série de ácidos adenílicos. Mesmo que essas seqüências não estejam bem estabelecidas, sabe-se que o capuz metilado 5' atua no complexo RNA-ribossômico, controlando assim o início da síntese da cadeia polipeptídica, protegendo o RNAm do ataque das enzimas fosfatase e exonuclease, mantendo a estabilidade da molécula. Responsável pelo transporte do RNAm do núcleo para o citoplasma, têm-se a cauda poli-A na extremidade 3', que também protege o RNA da desnaturação pelo calor e da ação de ribonucleases presentes no citoplasma (Busch et al., 1982; Cheng, 1980, 1981; Weatherall, 1997; Stamatoyannopoulos, 2005).

O processo de *splicing* é considerado fundamental para a formação do RNAm final que será traduzido em globina específica. A alta estabilidade molecular sob condições de intensa síntese do RNAm da globina, contribui muito para que os reticulócitos continuem a sintetizar hemoglobina por vários dias após a perda do núcleo (Honig; Adams III, 1986; Stamatoyannopoulos, 2005).

Os genes da globina beta contêm uma seqüência interposta menor de 130 bases e outra maior de 900 a 1100 bases, enquanto nos genes da globina alfa e zeta são pequenas, de 100 a 200 bases. As seqüências 5' dos genes gama e beta

influenciam, mas não controlam exclusivamente a regulação do desenvolvimento gênico, enquanto que nas regiões laterais 3' são observadas importantes seqüências reguladoras, sendo que essas apresentam características estruturais de genes altamente ativos na massa de cromatina, como a hipersensibilidade à DNase (Kaplan; Delpech, 1990; Roberts et al., 1997; Stamatoyannopoulos, 2005).

O estado de metilação dos genes da globina gama também sofre alteração durante o processo de desenvolvimento, sendo que nos eritroblastos fetais, as regiões promotoras são relativamente destituídas de modificações do grupo metil (hipometilação), enquanto que nos eritroblastos de adultos, os genes são metilados, característica esta associada à inatividade do gene. Nas células proeritroblásticas, a síntese de globina representa de 0,5 a 1% da síntese de proteína total, aumentando nas etapas seguintes de maturação. A ativação dos genes das globinas nos tecidos e no processo de desenvolvimento são dependentes de seqüências curtas de DNA denominadas intensificadoras, localizadas nas seqüências laterais 5' e 3' e possivelmente nos íntrons dos genes, ativando o complexo gênico beta, denominado de região controladora de *loci* (Kaplan; Delpech, 1990; Benz, 1997).

Estas seqüências reguladoras de DNA são denominadas elementos de atuação *cis*, exercendo efeitos biológicos através de sua interação com fatores *trans*, ou seja, proteínas de ligação do DNA nuclear, que promovem ou inibem a transcrição. Esses fatores ligam-se às seqüências promotoras e intensificadoras dos genes da globina, onde alguns deles parecem ser inespecíficos, uma vez que conseguem ativar numerosos genes em muitos tecidos, se tiver acesso a seus locais de ligação. Alguns desses fatores, como o GATA-1, NF-E2 e EKLF-1 são importantes para a ativação, porém nenhum deles é expresso apenas em células progenitoras eritróides (Forget, 1993; Jane; Cunningham, 1998; Hoffbrand; Pettit, 2000).

Cada gene possui características estruturais essenciais para a sua função normal, incluindo a presença de um local CAP necessário para o início da transcrição do RNAm precursor; codons de início e de término para sinalizar a tradução do RNAm maduro; presença dos sítios doador de excisão (GT) e aceitador de excisão (AG), marcando os pontos no precursor de RNAm onde os íntrons devem ser removidos e os exons ligados; seqüências de consenso circundando os dinucleotídeos do doador e aceitador que formam o sinal de união funcional e a

presença de seqüências não traduzidas 5' e 3' (Kaplan; Delpech, 1990; Forget, 1993; Stamatoyannopoulos, 2005).

Como sabemos, as hemoglobinas variantes e talassemias foram as primeiras doenças genéticas caracterizadas por metodologia molecular, representando um protótipo para o desenvolvimento de técnicas utilizadas no auxílio diagnóstico laboratorial através da biologia molecular (Schwartz, 1974; Old, 1996). São decorrentes de alterações estruturais ou reguladoras, alterando a proporção da síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas da molécula de hemoglobina (Pauling et al., 1949; Schwartz, 1974; Siguret; Andreux, 1997).

As hemoglobinas variantes resultam da substituição de um único aminoácido na cadeia polipeptídica, podendo ou não apresentar manifestações clínicas (Lehmann; Huntsman, 1974; Basset et al., 1982; Lukens; Lee, 1998; Grignoli et al., 1999). A substituição mais comumente observada na estrutura da hemoglobina ocorre na superfície externa da molécula e, normalmente, essa mutação é pontual e atinge a cadeia beta. Outras substituições ocorrem na superfície interna da molécula envolvendo aminoácidos polares e apolares, com a possibilidade de causar instabilidade molecular. O *crossing over* desigual resultante da fusão das cadeias do grupamento beta também é responsável pela presença de hemoglobinas variantes (Forget, 1979; Lukens; Lee, 1998; Hoffbrand; Pettit, 2000).

As talassemias alfa são representadas principalmente por deleções gênicas do que por mutações pontuais. Essas deleções podem ser favorecidas pela presença de um grande e variado número de seqüências repetidas, observando-se um aumento de bases G+C, podendo também ser resultado de recombinações recíprocas entre os cromossomos materno e paterno, ou de conversão gênica envolvendo os genes alfa (Poyart; Wajcman, 1996; Bernini; Harteveld, 1998).

As alterações genéticas capazes de levar à deficiência da produção das cadeias alfa podem ser determinadas por vários mecanismos como: mutações no codon de início dos genes alfa que impedem a tradução do RNAm; mutações no sítio de *splicing* que não permitem o correto processamento do RNAm; mutações que afetam o codon de terminação, levando à formação de cadeias alfa alongadas, instáveis e com menor ritmo de síntese; mutações de ponto em regiões codificantes que resultam na produção de hemoglobinas instáveis; mutações no sítio poli-A produzindo RNAm instável e que afeta a expressão do gene alfa1 adjacente; e deleções envolvendo a seqüência controladora da expressão dos genes alfa (Orkin

et al., 1981; Weatherall, 1994; Kattamis et al., 1996; Harteveld et al., 1997; Wenning, 1999).

As deleções gênicas envolvendo um ou ambos os genes alfa são as causas mais freqüentes das talassemias alfa. A região cromossômica onde estão localizados os dois genes alfa, presente em cada alelo é reconhecidamente dividida em segmentos que apresentam grande homologia em bases (X, Y, Z) e elementos não homólogos (I, II, III). A recombinação entre os segmentos Z resulta α^+ talassêmicos com uma deleção à direita ($\alpha^{3,7}$), enquanto que entre os segmentos X resulta na deleção à esquerda ($\alpha^{4,2}$). Em ambos os casos, diversos subtipos podem ser distinguidos de acordo com o ponto exato de recombinação. Os homozigotos para a deleção $\alpha^{4,2}$ possuem teoricamente os dois genes $\alpha 2$ ausentes, mas a quantidade de globina alfa sintetizada é maior que 25%. Por sua vez, aqueles homozigotos para a deleção $\alpha^{3,7}$, que possuem os dois genes $\alpha 2$, expressam somente metade da quantidade normal de globina alfa e aproximadamente 75% do esperado. Apesar do significativo número de outras deleções responsáveis pelo aparecimento de talassemia alfa, essas duas últimas são as mais freqüentes nas populações humanas (Surrey et al., 1978; Higgs et al., 1979; Embury et al., 1980; Michelson; Orkin, 1983; Lacerra et al., 1991; Romao et al., 1991; Old, 1996; Poyart; Wajcman, 1996).

As alterações no gene beta responsáveis por talassemias do tipo beta caracterizam-se principalmente por mutações pontuais e menos freqüentemente por deleções, resultando na ausência das cadeias beta (β^0 talassemia) ou na redução em seu conteúdo (β^+ talassemia). Como resultado dessas alterações, a síntese de cadeia de globina torna-se desregulada e inicia-se a produção de um excesso de cadeias alfa, precipitando-se nos precursores das células vermelhas, sendo esses destruídos na medula óssea ou no sangue periférico (Schwartz, 1974; Weatherall, 1995; Old, 1996).

Essas alterações genéticas responsáveis pela deficiência da produção das cadeias beta afetam um número pequeno de pares de bases e são determinadas por mecanismos que interferem na transcrição, na estabilidade do RNAm e na tradução do RNAm, sendo um pequeno número de alelos específicos responsável por aproximadamente 90% das mutações beta talassêmicas, de acordo com as populações analisadas, identificando-se principalmente mutações como

β^0 39 (C→T), β^+ IVS I-110 (G→A), β^+ IVS I-6 (T→C), β^0 IVS I-1 (G → T), IVS II-745 (C→G), dentre outras (Naoum, 1997).

2. Métodos diagnósticos para análise de DNA

Na presença de uma mutação reconhecida como responsável por uma patologia, pode-se analisar o gene, sua posição no genoma e o produto responsável pelo desempenho do mesmo. Se o gene não foi clonado, a identificação do polimorfismo através das diferenças de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) por sondas intimamente ligadas fornecem dados de valores inestimáveis para aconselhamento genético e, o diagnóstico com base no DNA, pode detectar heterozigotos assintomáticos. Devido a esses fatores, testes baseados em estudos do DNA tornaram-se os métodos de diagnóstico de escolha para doenças hereditárias e várias anomalias genéticas podem ser diagnosticadas utilizando as técnicas de DNA recombinante (Costa, 1991; Zaha, 1996).

Com o advento da biologia molecular, surgiu a possibilidade do uso de mecanismos úteis no auxílio diagnóstico laboratorial através do estudo do DNA e numerosos testes foram aplicados, sendo que alguns deles lançavam mão do material genético matriz total e outros de parte desse material, algumas vezes amplificado, outras hibridizado, ou então clonados (Zaha, 1996).

Sabe-se que o princípio do pareamento específico entre os nucleotídeos representa a base da tecnologia requerida para o estudo da estrutura e expressão gênica. Como exemplo podemos citar a hibridização molecular, que pelo elevado grau de especificidade da complementaridade entre as seqüências de bases, uma molécula com hélice simples pode ser marcada por isótopos radioativos e utilizada como sonda para seu DNA complementar, mesmo em uma mistura complexa em que a seqüência a ser identificada representa somente 1 em 10^6 moléculas de DNA (Saiki et al, 1988; Costa, 1991).

As endonucleases de restrição são enzimas capazes de clivagem de moléculas de DNA de dupla hélice somente em locais específicos determinados pela seqüência de nucleotídeos, sendo utilizadas no diagnóstico molecular. Após a ação das endonucleases em amostras de DNA genômico, os fragmentos obtidos podem ser separados de acordo com seu tamanho por eletroforese em gel de agarose e transferidos para membranas de nitrocelulose ou nylon, com possibilidade de

hibridização e revelação, caracterizando a reação de *Southern blotting* (Costa, 1991; Zaha, 1996; Nollau; Wagener, 1997).

A digestão do genoma humano com enzimas de restrição e a posterior recombinação desses fragmentos com vetores bacterianos apropriados permitem a produção de bancos de genes e bibliotecas gênicas onde estão representados todos os genes do genoma. Assim, podem-se utilizar sondas especiais para isolar e purificar um gene ou parte específica do mesmo (Costa, 1991).

A possibilidade de determinação da seqüência de bases nitrogenadas de um determinado fragmento de DNA foi possível após o desenvolvimento de métodos de clonagem molecular (Costa, 1991).

A amplificação gênica pela reação em cadeia catalisada pela polimerase (PCR) é um método de biologia molecular que permite a produção de grande quantidade de fragmentos específicos de DNA a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas. Basicamente, esse procedimento permite a amplificação de um fragmento específico de DNA escolhido pelo investigador, cuja concentração final excede em milhares de vezes a do restante do DNA presente na amostra analisada (Costa; Costa, 1992; Nollau; Wagener, 1997).

Os métodos anteriormente empregados no estudo de determinado fragmento de DNA tinham como objetivo comum aumentar a sensibilidade da detecção do fragmento alvo, que estava presente em baixa concentração na amostra. Ao contrário, a PCR é capaz de aumentar de forma significativa o número de fragmentos gênicos escolhidos por intermédio da síntese enzimática de numerosas cópias do fragmento original. Assim, a PCR pela sua rapidez, sensibilidade, especificidade e relativa simplicidade técnica, possui grande aplicação no diagnóstico pré-natal de doenças hereditárias, como anemia falciforme e talassemias, prevenção de desordens genéticas, triagem de banco de genes, detecção de polimorfismos de restrição, entre outras (Newton et al., 1989; Okayama et al., 1989; Costa; Costa, 1992; Nollau; Wagener, 1997).

Hoje em dia as metodologias tentam utilizar mecanismos que sejam mais rápidos, mais baratos, mais resolutivos e que permitam ter um parâmetro padrão e de qualidade.

Em relação à identificação de hemoglobinopatias por metodologia molecular, várias técnicas são utilizadas (Clark e Thein, 2004). Segundo Kulozik et al. (1988), o método padrão para o diagnóstico pré-natal de hemoglobinopatias pode

ser realizado pelo mapeamento de enzima de restrição do DNA de vilosidades córion alantóide (trofoblastos) utilizando *Southern blotting*; uma melhora do procedimento permitiu visualização do fragmento de restrição diretamente, sem o uso de radioatividade, e no prazo de dois dias após obtenção da amostra. De acordo com Sutcharithchan e Embury (1996), o advento do diagnóstico molecular para desordens na molécula de hemoglobina ocorreu em resposta a necessidade de métodos melhorados para o diagnóstico pré-natal.

As sondas oligonucleotídicas alelo específicas (ASOs) têm sido utilizadas para detectar diversas mutações, entre elas as hemoglobinas variantes e talassemias beta, pesquisando-se a mutação, através da utilização de sondas planejadas para hibridizar seletivamente com uma determinada região correspondente ao alelo normal e ao alelo mutante; essas sondas podem ser utilizadas desde que a seqüência nucleotídica seja conhecida. O diagnóstico de patologias utilizando essa metodologia não consiste em um método tão simples para a rotina laboratorial, pois cuidados excessivos devem ser tomados para alcançar as condições de hibridização, responsáveis por um resultado confiável e reprodutivo, além do método demonstrar melhor resolução com o uso da radioatividade, podendo-se utilizar marcadores “a frio” (Vago; Pena, 1997). De acordo com Bienvenu et al. (1992), a técnica de ASO foi utilizada para detectar principalmente IVS I-110; a mutação no codon 39 pode ser determinada pelo uso da enzima de restrição Mae I, dentre outras, contudo os resultados são algumas vezes indefinidos e o custo da enzima pode inviabilizar seu uso para diagnóstico de rotina.

Também foi descrita a utilização de um Kit (Bio-Rad Laboratories) para a determinação qualitativa das oito mutações mais comuns de beta talassemia identificadas de origem mediterrânea, utilizando o princípio de hibridização oligonucleotídica alelo específica (Ugozzoli et al., 1998).

A PCR tem simplificado o uso de ASO, de *Southern blotting* e de outras metodologias (Fischel-Ghodsian et al., 1990; Zaha, 1996), sendo ideal melhorar e simplificar o diagnóstico e triagem de hemoglobinopatias por métodos moleculares como, por exemplo, a amplificação gênica alelo específica e multiplex.

A reação em cadeia da polimerase alelo específica (PCR-AE) detecta diretamente a mutação responsável pelas doenças genéticas, além de ser um método não radioativo, não requer clivagem enzimática e os resultados são visualizados após uma simples migração eletroforética, podendo complementar a

rotina dos métodos laboratoriais para determinar o genótipo em questão. Uma grande vantagem dessa metodologia é facilitar a prevenção e a aplicação de programas de controle bem como o aconselhamento genético de talassemias e hemoglobinas variantes nas diversas regiões onde estas alterações são prevalentes, principalmente pela detecção de homozigotos, heterozigotos e interações (Bienvenu et al., 1992; Vago; Pena, 1997; Clarke; Higgins, 2000; Fucharoen et al., 2001, Waterfall; Cobb, 2001).

Essa metodologia pode ser adaptada utilizando-se vários *primers*, sendo cada um deles dirigido específico ao ponto de mutação (multiplex) e com a possibilidade de detecção de mutações relacionadas a talassemia beta e principalmente a talassemia alfa, além de ser utilizada para o diagnóstico diferencial de Hb S e Hb D, para a identificação de várias deleções do gene alfa em um único tubo de ensaio, dentre outras, facilitando assim o programa de triagem de hemoglobinopatias nas regiões estudadas (Fucharoen; Fucharoen, 1994; Tan et al., 2001; Zeng; Huang, 2001; Sanchaisuriya et al., 2004).

A seleção dos *primers* utilizados na PCR-AE é baseada em alguns critérios como: os dois *primers* alelo específicos diferem em um nucleotídeo na porção 3' final ou na penúltima posição; o comprimento dos *primers* deve ser de 17 a 24 nucleotídeos; o *primer* não específico deve encontrar-se a uma distância de 200-400 pb e, se possível, domínios ricos em CG entre os *primers* devem ser evitados; o comprimento do *primer* não específico varia até que sua T_m (temperatura de *melting*) e a do *primer* alelo específico sejam similares e a seleção de *primers* deve ocorrer de forma que não proporcione a formação de região própria complementar (Postnikov et al., 1993).

As reações alelo específicas e multiplex demonstram ser reprodutíveis e um método de aplicação universal para mutação conhecida, tornando-se muito atrativo pela rapidez, custo relativamente baixo, sem uso de radioatividade e de fácil comercialização.

3. Hemoglobinas variantes, talassemias e interações observadas na população brasileira

As hemoglobinopatias são decorrentes de alterações estruturais ou reguladoras nos genes, podendo-se também verificar situações na qual ocorrem

interações de desordens genéticas entre hemoglobinas variantes e talassemias quer seja na forma “zero”, quando não ocorre produção de cadeia, ou na forma “mais”, quando pequenas quantidades de cadeias são estruturadas, podendo ser ocasionadas por mutações, como por exemplo, de ponto na estrutura nucleotídica, deleções ou *crossing over* desigual entre cromátides parentais (Honig; Adams III, 1986; Siguret; Andreux, 1997).

A população brasileira apresenta um alto grau de mistura racial como resultado inicial da imigração dos colonizadores e posteriormente de outros povos, bem como da intensa miscigenação ocorrida entre eles e os nativos. Neste contexto, as hemoglobinopatias representam um defeito genético com frequências relacionadas à diversidade das origens e diferentes miscigenações regionais.

As anormalidades mais comuns e de importância em Saúde Pública são representadas pelas Hb S, Hb C, talassemias beta e alfa nas suas formas heterozigotas, sendo que as homozigotas ou duplos heterozigotos como Hb S/Hb C, Hb S/ β -talassemia, Hb S/ α -talassemia e Hb C/ β -talassemia apresentam pequenas porcentagens, sendo próprias da livre miscigenação de populações provenientes do Mediterrâneo e principalmente da África (Zago; Costa, 1985; Sonati; Costa, 1990; Costa et al., 1991; Paiva e Silva et al., 1993).

Pesquisas populacionais realizadas para verificar os polimorfismos genéticos humanos das hemoglobinas em diferentes grupos étnicos de nosso país foram capazes de detectar hemoglobinas variantes consideradas não tão comuns, como, por exemplo, a Hb G ($\alpha 68$ Asp \rightarrow Lis), Hb Porto Alegre ($\beta 9$ Ser \rightarrow Cis), Hb I ($\alpha 16$ Lys \rightarrow Glu), Hb Niterói ($\beta 42-44$ Phe/Glu/Ser \rightarrow 0), Hb D Punjab ($\beta 121$ Glu \rightarrow Gln), Hb J Rovigo ($\alpha 53$ Ala \rightarrow Asp), Hb O Árábica ($\beta 26$ Glu \rightarrow Lys) e Hb Santa Ana ($\beta 88$ Leu \rightarrow Pro), além dos fenótipos considerados talassêmicos, a Hb Lepore (fusão $\delta\beta$) e Hb Constant Spring ($\alpha 142$ Stop \rightarrow Gln) (Salzano; Tondo, 1982; Zago; Costa, 1985; Naoum et al., 1987; Gonçalves et al., 1994a; Sutcharithchan; Embury, 1996).

Através de estudos realizados por vários pesquisadores que se ocupam dessas caracterizações foi possível identificar outras alterações estruturais e que apresentam frequência reduzida em nossa população, tais como a Hb Rio Claro ($\beta 34$ Val \rightarrow Met), Hb Campinas ($\alpha 26$ Ala \rightarrow Val), Hb Hasharon ($\alpha 47$ Asp \rightarrow His), Hb Stanleyville-II ($\alpha 78$ Asn \rightarrow Lys), Hb G-Pest ($\alpha 74$ Asp \rightarrow Asn), Hb Zürich ($\beta 63$ His \rightarrow Arg), Hb Korle Bu ($\beta 73$ Asp \rightarrow Asn), Hb Camperdown ($\beta 104$ Arg \rightarrow Ser), além de

hemoglobinas consideradas ainda mais raras em vista de nossa origem formadora, como a Hb Kurosaki ($\alpha 7$ Lys \rightarrow Glu) e a Hb Westmead ($\alpha 122$ His \rightarrow Gln) (Zago et al., 1982; Miranda et al., 1994; Miranda et al., 1996; Bertuzzo et al., 1997; Grignoli et al., 1999; Wenning et al., 2000a, b; Bonini-Domingos et al., 2005).

Hemoglobina S, C e interações

A hemoglobina S caracteriza-se pela sua freqüência em populações de origem africana, também observada em descendentes árabes e indianos; cerca de 8% dos negros norte-americanos são portadores do gene S e semelhante porcentagem pode ser verificada em nosso país (Allison, 1964; Zago et al., 1983; Flint et al., 1998; Ashley-Koch et al., 2000). De acordo com alguns autores, no Brasil a presença do gene S atinge 4 milhões de heterozigotos e 30 mil homozigotos ou outras formas consideradas raras e associadas à ela (Paiva; Silva et al., 1993; Alvares Filho et al., 1995; Naoum, 1997; Bonini-Domingos, 2004).

A presença do gene S acarreta uma das patologias hereditárias prevalentes no Brasil, representada por uma alteração de ponto no códon 6 do gene da globina beta [$\beta 6$ (A3) Glu \rightarrow Val], sendo a caracterização e distribuição dos diferentes haplótipos β^S representados por 60% Bantu, 30% Senegal e 10% Benin (Gonçalves et al., 1994b; Pante-de-Sousa et al., 1999; Zago et al., 2000).

As hemoglobinas variantes consideradas assintomáticas também estão presentes na população brasileira, sendo que a Hb C e sua interação com as talassemias beta e a persistência hereditária de hemoglobina fetal pode ser verificada, com prevalência de 0,5 a 1% (Naoum, 1997).

Na interação Hb S/ Hb C, a detecção dessa última não pode ser realizada por endonuclease de restrição (mutação G \rightarrow A no codon 6) pois até o momento não existe uma enzima que reconheça essa seqüência mutada, sendo necessário sua caracterização por hibridização oligonucleotídica alelo específica (Honig; Adams III, 1986; Marmitt et al., 1986; Fischel-Ghodsian et al., 1990).

Para a caracterização da presença desses genes, pode-se utilizar oligonucleotídeos complementares sintéticos para as seqüências de globinas beta A, beta S e beta C, que são usados como provas de hibridização para triagem de amostras de DNA genômico humano. Esses resultados mostram que a hibridização

com provas oligonucleotídicas, diferente da análise de RFLP, pode ser usada para distinguir diretamente os três alelos de globina beta, quando presentes em heterozigose ou homozigose (Studencki et al., 1985).

A anemia falciforme pode ser identificada com enzimas de restrição que possibilitam o reconhecimento de uma seqüência específica e diretamente sobre o local de mutação, podendo também ser caracterizada por reação em cadeia da polimerase alelo específica (PCR-AE), permitindo a detecção direta do alelo normal ou mutante no DNA genômico, sem provas adicionais de hibridização, ligação ou clivagem com enzima de restrição (Wu et al., 1989; Fischel-Ghodsian et al., 1990; Costa et al., 1991; Postnikov et al., 1993; Figueiredo et al., 1996; Clarke; Higgins, 2000; Waterfall; Cobb, 2001).

Hemoglobina D e interações

A Hb D [β 121(GH4)Glu→Gln], conhecida por D Punjab ou D Los Angeles, apresenta uma freqüência de 3% na população de Punjab (Índia), mas também foi observada em diversos outros grupos étnicos (Itano; Neel, 1950; Schnee et al., 1990; Fioretti et al., 1993; Postnikov et al., 1993; Sanchaisuriya et al., 2004).

No nosso país, a ocorrência de Hb D Los Angeles foi relatada inicialmente por Zago e Costa (1988) em quatro famílias brasileiras em estado de heterozigose, duplo heterozigoto Hb D/ β^+ talassemia e interação Hb S/ Hb D.

Em estudo populacional realizado a Hb D, em sua forma heterozigota, foi encontrada em 1 para cada 5 mil pessoas analisadas (Naoum, 1997). Também foi relatado por Naoum et al. (2002) a interação entre Hb D e talassemia beta em um indivíduo brasileiro e seus familiares.

A detecção desta alteração pode ser realizada através de seqüenciamento direto do produto da PCR, RFLP e análise de *Southern blotting* (Fioretti et al., 1993; Akar et al., 1995), podendo também ser identificada por PCR-AE e multiplex de acordo com Sanchaisuriya et al. (2004).

Talasseмии do tipo beta e interações

As talasseмии beta mais freqüentes são representadas pelas mutações IVS I-110, CD 39, IVS I-6, IVS I-1 e IVS II-745, prevalentes na bacia Mediterrânea,

principalmente na parte oriental/leste, incluindo populações da Turquia, Cipriota, Libaneses e Búlgaros. Também é freqüente na população da Sardenha, atingindo parte da Europa (Itália, Espanha e Portugal) e Norte da África (Tunísia), onde a maioria das mutações é causada pela substituição de um único nucleotídeo, afetando a transcrição do RNA, processamento ou tradução (Bienvenu et al., 1992; Alfarano et al., 1990; Losekoot et al., 1990).

Dentre as talassemias beta detectadas na população brasileira evidenciou-se heterogeneidade dos genes responsáveis por essa patologia, com distribuição semelhante à observada na população italiana, sendo as mais prevalentes as caracterizadas como β^0 codon 39 (C \rightarrow T), β^+ IVS I-6 (T \rightarrow C), β^+ IVS I-110 (G \rightarrow A) perfazendo mais de 90% e β^0 IVS I-1 (G \rightarrow T) e IVS II-745 (C \rightarrow G), em menor porcentagem (Zago et al., 1981; Costa et al., 1991; Costa et al., 1992; Moreira, 1996; Naoum, 1997). Estudo realizado por Sonati et al. (1996) confirmou, através de análise molecular, que a freqüência de beta talassemia em heterozigose encontra-se em torno de 64% para CD 39, 20% para IVS I-110 e, 7 e 6% para IVS I-6 e IVS I-1, respectivamente, na população analisada.

Várias metodologias são utilizadas para a caracterização dos genótipos de talassemias beta, sendo as mais comuns a hibridização oligonucleotídica alelo específica (ASO) marcada com radioatividade ou marcação fria e a análise com endonuclease de restrição, quando possível. Este método possibilita a detecção das mais comuns mutações na população Mediterrânea, com freqüências que variam de acordo com a região analisada, sendo comum atingir, quando em homozigose, até 1% da população caucasóide (Bunn; Forget, 1986; Coutinho Gomes et al., 1988; Alfarano et al., 1990; Lindeman et al., 1991; Rosatelli et al., 1992; Maggio et al., 1993; Weatherall, 1994; Varela et al., 1996; Bertuzzo et al., 1997).

A detecção da interação do gene S e talassemias beta também pode ser realizada por amplificação gênica e clivagem com enzimas de restrição dos produtos amplificados ou pela hibridização oligonucleotídica alelo específica (ASO) (Chehab et al., 1987; Saiki et al., 1988).

A reação em cadeia da polimerase alelo específica (PCR-AE) auxilia na identificação das talassemias beta, detectando diretamente a mutação responsável, e diferenciando homozigotos, heterozigotos e interações (Bienvenu et al., 1992).

Hb Lepore

A interação das cadeias delta/beta na Hb Lepore Baltimore ($\delta 50\text{Ser} \beta 86\text{Ala}$) foi determinada em 1960, sendo sua porção aminoterminal composta de resíduos 1-87 de cadeia delta e a carboxiterminal de resíduos 116-146 de cadeia beta. O gene mutante resulta da fusão da porção 5' do gene delta e da porção 3' do gene beta levando a deleção de 7,4 Kb na região delta/beta, provavelmente como resultado de uma recombinação desigual própria do evento de não pareamento durante a meiose (Metzenberg, 1991; Miranda et al., 1994).

Essa hemoglobina foi descrita como rara, sendo identificada em três famílias diferentes e residentes em Baltimore, logoslávia e nordeste da Sardenha, bem como em poucas famílias da Espanha. Miranda et al. (1994) descreveram o primeiro caso de Hb Lepore Baltimore na América do Sul, identificando heterozigotos na população brasileira e proporcionando dados da seqüência na região de quebra desta variante. Os autores utilizaram técnicas com enzima de restrição e também o seqüenciamento gênico, demonstrando as alterações no gene da globina delta acima do codon 68, enquanto a primeira base específica para o gene da globina beta era no codon 86 do segundo exon. Os dados da seqüência nucleotídica indicam que o ponto do *crossing over* da Hb Lepore Baltimore encontra-se dentro de uma região de 51 pb no segundo exon (Metzenberg, 1991; Miranda et al., 1994; Ribeiro et al., 1997).

Talassemias do tipo alfa

As talassemias do tipo alfa são, em relativa freqüência, resultados da produção diminuída de cadeia alfa por comprometimento de apenas um dos quatro genes alfa, o que dificilmente é detectado nas eletroforeses tradicionais. Com os avanços do diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias, verificam-se nas populações freqüências cada vez maiores destas patologias.

De acordo com Bunn e Forget (1986) e Weatherall (1994), as talassemias alfa estão presentes em 25% da população da raça negra, sendo as alterações mais comuns as representadas pela deleção $\alpha^{3,7}$ apresentando distribuição mundial, com freqüência elevada na África, Ásia e regiões mediterrâneas, enquanto a deleção $\alpha^{4,2}$

é mais prevalente no sudeste asiático (Higgs et al., 1979; Embury et al., 1980; Higgs et al., 1984; Foglietta et al., 1996; Chui et al., 2003), com uma frequência variando de 2,2% até mais de 26% em algumas regiões; mais de 80% das deleções identificadas nas populações são as $\alpha^{3,7}$ (Jones; Poon, 2002).

Uma determinada população pode apresentar a coexistência das deleções $\alpha^{3,7}$ e $\alpha^{4,2}$ em frequências altas, embora a $\alpha^{3,7}$ tem uma distribuição bem mais ampla (Lauer et al., 1980).

Em estudos realizados no interior do Estado de São Paulo, a prevalência de Hb Bart's em recém-nascidos negros foi reportada com uma média de 12% (Sonati; Costa, 1990), o que representaria a hemoglobinopatia de maior frequência detectada no Brasil.

Alguns casos esporádicos de doença de Hb H foram descritos e a análise molecular destes revelou a presença das deleções $\alpha^{3,7}$ e α^{--MED} (Zago et al., 1984; Sonati et al., 1991). Estudo realizado por Sonati e Costa (1990), em população negra de São Paulo, demonstrou uma frequência de 23,4% para a deleção $\alpha^{3,7}$. Utilizando a técnica de *Southern blotting* identificou-se em indivíduos negróides e portadores de anemia falciforme, 22% de heterozigotos e 1,5% de homozigotos para a deleção $\alpha^{3,7}$ (Costa et al., 1989; Sonati; Costa, 1990; Sonati et al., 1991; Figueiredo et al., 1996).

Em Salvador, estudo realizado com gestantes apresentando perfil eletroforético normal demonstrou frequência de 17,2% de portadores de $\alpha^{3,7}$ (Adorno et al., 1998).

Wenning (1999) relatou que não havia casos de hidropsia fetal descritos na população brasileira, podendo este fato ser atribuído, provavelmente, à baixa frequência do alelo α^0 nesta população.

Para a identificação da talassemia alfa, existem métodos convencionais preconizados como a análise de cadeia globínica e/ou a análise gênica pela técnica de *Southern blotting*. Estes procedimentos são complexos, necessitam de muito tempo para execução, apresentando ainda alto custo e utilização de isótopos radioativos, o que inviabiliza sua utilização nos laboratórios de rotina (Galanello et al., 1998; Shaji et al., 2000).

Com o advento das técnicas de análise do DNA, a determinação precisa das mutações e sua frequência nas diferentes partes do mundo foi viabilizada

(Weatherall, 1994). Através da reação em cadeia da polimerase multiplex, a detecção de talassemia alfa tornou-se mais viável (Oron-Karni et al., 1998), sendo esta de fácil e rápida execução, apresentando custo acessível, não necessitando da utilização de material radioativo, além da fácil interpretação em relação ao método de *Southern blotting* (Chong et al., 2000).

Hemoglobina Constant Spring

A Hb Constant Spring foi descoberta na década de setenta, na cidade de Constant Spring (Jamaica) em uma grande família chinesa, sendo que três crianças apresentavam doença de Hb H, com a presença de 5 a 20% dessa hemoglobina e quantidades variáveis de Hb Bart's (Clegg; Weatherall, 1971).

Essa hemoglobina caracteriza-se por um alongamento na cadeia do gene da globina $\alpha 2$ [CS^{TAA→CAA} (+31aa)], devido uma mutação no codon terminal do gene prolongando a transcrição e produzindo um RNAm $\alpha 2$ instável, que codifica uma proteína de 172 resíduos ao invés de 141 resíduos como na globina normal. Constitui-se a principal causa de talassemia alfa não deletional encontrada no sudoeste da Ásia, China meridional e outras regiões (Clegg; Weatherall, 1971; Viprakasit et al., 2002; Chui et al., 2003).

A forma heterozigota para Hb CS ($\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$) é difícil de ser detectada pelas técnicas clássicas, como a eletroforese de hemoglobinas, devido à produção da mesma encontrar-se muito baixa (0-1%) e os dados hematológicos apresentarem-se normais (Nogueira et al., 2000).

A detecção correta desta alteração auxiliaria na triagem de portadores e na identificação pré-natal. Um diagnóstico confiável pode ser obtido pelo uso de enzima de restrição MseI, ASO ou principalmente PCR-AE (Chen et al., 1993; Makonkawkeyoon et al., 1993; Fucharoen; Fucharoen, 1994; Nogueira et al., 2000; Viprakasit et al., 2002).

OBJETIVOS

Considerando que alguns pacientes reconhecidamente portadores de uma anemia hemolítica hereditária devido a presença de uma alteração na molécula de hemoglobina;

Considerando que os exames de rotina laboratorial não são sempre capazes de caracterizar a alteração genética responsável pela hemoglobinopatia;

Considerando que, mesmo quando se lança mão das técnicas de biologia molecular, elas nem sempre são totalmente informativas, confiáveis e reprodutíveis.

Foram propósitos do presente trabalho:

1. Estabelecer metodologia laboratorial embasada em estudo molecular que possibilite o auxílio diagnóstico de hemoglobinas anormais observadas na população brasileira e sem caracterização completa ou pouco informativa.

2. Utilizar *primers* que se acoplem exatamente na posição da mutação do alelo mutante e na respectiva posição do alelo normal, com possibilidade da realização de amplificação gênica alelo específica e multiplex.

3. Com esses conhecimentos, estabelecer protocolos de aplicação laboratorial para uso na rotina.

CASUÍSTICA E METODOLOGIA

1. Casuística

O material de análise foi fornecido por laboratórios que realizam diagnóstico laboratorial de hemoglobinas, sendo que as amostras de estudo foram constituídas por 20 modelos de mutações de portadores que apresentavam alterações em seu perfil eletroforético.

Os indivíduos eram de ambos os sexos, com diferentes idades e características raciais (caucasóides e não caucasóides) e pertencentes às diversas classes econômicas.

O presente estudo pretendia incluir o maior número possível de amostras relacionadas a fenótipos diferentes de hemoglobinas e da maioria das mutações observadas na população brasileira, sendo que, conseguimos analisar por amplificação gênica alelo específica e multiplex, as seguintes mutações:

Hemoglobinas variantes com alteração de um nucleotídeo: Hb SS/Hb AS/Hb CC/Hb AC/Hb AD/ Hb DD.

Talasseмии do tipo beta: β^0 talassemia / β^+ talassemia / Hb Lepore.

Interações entre hemoglobinas variantes: Hb SC / Hb SD.

Interações entre hemoglobinas variantes e talassemia do tipo beta: Hb S β^+ talassemia/ Hb C β^+ talassemia.

Talasseмии do tipo alfa: α^0 talassemia/ α^+ talassemia/ Hb Constant Spring.

Como o intuito do trabalho era verificar e caracterizar genótipos, os critérios de inclusão basearam-se unicamente na presença das patologias de interesse para os objetivos propostos, sendo os critérios de exclusão o paciente ter sofrido transplante de medula óssea.

O presente trabalho encontra-se adequado e em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, e com parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, sob protocolo número 15/2003.

2. Metodologia

2.1 Extração e quantificação do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de sangue total através do método de Miller et al. (1988) modificado, baseado em precipitação do material genético por solução de NaCl saturada (6M). No material extraído, realizou-se a verificação da pureza em gel de agarose e a quantificação espectrofotométrica, pelos métodos padrão conhecidos e validados (Abdel-Rahman, 1994).

2.2 Amplificação do DNA genômico

A amplificação do material genético para a identificação dos genótipos de anemia e traço falciforme e hemoglobina C, de talassemias beta codon 39, IVS I-110, IVS I-6 e IVS I-1 e Hb D em homozigose, heterozigose e interações e Hb Constant Spring, foi realizada pela técnica de amplificação gênica alelo específica (PCR-AE) e a identificação da interação HbS/ HbD, Hb Lepore e talassemias alfa por PCR multiplex em um único tubo.

A PCR-AE processou-se em pelo menos dois tubos; em um deles foi acrescentado, além dos produtos base, dois *primers*, um sense e outro antisense, que permitiam a verificação da funcionalidade da PCR e um *primer* com seqüência complementar à posição normal no genoma; no outro tubo foram acrescentados os mesmos dois *primers* iniciais e um *primer* com seqüência complementar à região da mutação analisada. Dessa forma foi possível verificar o genótipo do probando, na dependência da verificação do produto amplificado: quando presente apenas no primeiro tubo demonstra um indivíduo normal; se a amplificação positiva for verificada no tubo 1 e 2, caracteriza um indivíduo heterozigoto para a mutação analisada; se o material amplificado tiver resposta apenas no tubo 2, fica evidenciado um indivíduo homozigoto para a mutação em questão. Algumas vezes, e na dependência de nossa estratégia, poderiam ser utilizados mais tubos e maior número de *primers*.

A PCR multiplex realizou-se em um único tubo, onde vários *primers* sense e antisense foram adicionados simultaneamente na reação para identificar mutações de acordo com o interesse do estudo, podendo-se diferenciar o alelo normal do

mutante, e também os estados de homozigose e heterozigose, com exceção, no trabalho, de homozigose para Hb Lepore.

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

2.3 Identificação dos genótipos AA, AS, SS, AC, CC e SC

Na determinação genotípica utilizamos 3 tubos para cada amostra de DNA, sendo a reação de PCR-AE baseada no protocolo de Fischel-Ghodisian et al. (1990) com algumas modificações de nosso laboratório e realizada para um volume final de 100 μ L de reação acrescentando 20 mmol/L de tampão, 0,2 mmol/L de cada dNTP; 1,5 mmol/L de $MgCl_2$; 1,25 U de Taq DNA polimerase (Gibco-BRL); 50,0 a 100,0 ng de DNA genômico e 0,2 μ mol/L de cada *primer*, sendo no tubo 1 adicionados os *primers* Beta 5'-a, Beta 5'-b e Beta A-b; no tubo 2 os *primers* Beta 5'-a, Beta 5'-b e Beta C-b e no tubo 3 *primers* Beta 5'-a, Beta 5'-b e Beta S-b. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por 5 minutos, acrescida de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C 1 minuto, 65°C por 2 minutos seguida de uma extensão final a 65°C por 5 minutos. A análise dos produtos foi verificada em gel de agarose a 2%, evidenciadas com brometo de etídio e visualizadas sob transluminador.

A seqüência parcial de nucleotídeos referente ao gene *Human beta globin* utilizada para a amplificação do fragmento de interesse está depositada no GenBank sob as coordenadas *Locus HUMHBB*, sendo que o gene completo possui 73.308 pb (Figuras 2 a 17).

61828
 ACGATCTTCAATATGCTTACCAAGCTGTGATTCCAAATATTACGTAATACACTTGCAAAGGAGGATGTTTTAGTAGCAATT
 TGTA CTGATGGTATGGGGCCAAGAGATATATCTTAGAGGGAGGGCTGAGGGTTGAAGTCCAACCTCCTAAGCCAGTGCCA
 GAAGAGCCAAGGACAG**GTACGGCTGTCACTAGACCTCA**CCCTGTGCTCGAGCCACACCCTAGGGTTGGCCAATCTA
 CTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTG**CTTACATTTGCTTCT**
GACACAACTGTGTTCACTAGCA**ACAACAGACACC**ATGGTG**CACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCT**
GTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGGGCAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTAAGG
 AGACCAATAGAAA**ACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTGCCTATTGGTC**
 TATTTTCCACCCTTAGCTGCTGGTGGTCTACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTG
 ATGCTGTTATGGGCAACCTTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAGAAAGTCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCCTGGCTCACCTG
 GACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACTGAGTGAGCTGCACTGTGACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACTCAGGGT
 GAGTCTATGGGACCC**TTGATGTTTTCTTCCCTT**CTTTCTATGGTTAAGTTCATGTGCATAGGAAGGGGAGAAGTAAACAGG
 GTACAGTTTAGAATGGGAAACAGACGAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTTCTTTTATTGCTGT
 CATAACAATTGTTTTCTTTGTTAATTCTTGCCTTTCTTTTTTTCTTCTCCGCAATTTTACTATTATACTTAATGCCTTAACA
 TTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTCTGAGATACATTAAGTAACTTAAAAAAAACCTTACACAGTCTGCCTAGTACATTA
 TTTGGAATATATGTGCTTATTGCATATTCATAATCTCCCTACTTTTCTTTTATTGATACATAATCATTATAC
 ATATTTATGGGTTAAAGTGAATGTTTTAATATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAATTTAAAAA
 ATGCTTTCTCTTTAATATACTTTTTGTTTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTGAGGGCAATAATGATACA
 ATGTATCATGCCTCTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAA
 ATATTTCTGCATATAAATTGTAAGTGTAAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTA
 TTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCTC
 CCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATTCACCCCAACAGTGCAGGCTGC
 CTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGGCTAATGCCCTGGCCACAAGTATCACTAAGCTCGCTTTCTGCTGTCCAATTTCT
 ATTAAGGTTCCCTTTGTTCCCTAAGTCCAACCTACTAACTGGGGGATATTATGAAGGCCCTTGAGCATCGGATTCTGCCT
 AATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAATGATGATTTAAATTATTTCTGAATATTTACTAAAAAGGAATGTGGGAGGTCAG
 TGCATTTAAAACATAAAGAAATGAAGAGCTAGTTCAAACCTTTGGGAAAATACACTATATCTTAAACTCCATGAAAGAAGGTGA
 GGCTGCAAACAGCTAATGCACATTGGCAACAGCCCTGATGCCTATGCCTTATTTCATCCCTCAGAAAAGGATTCAAGTAGAG
 GCTTGATTTGGAGGTTAAAGTTTTGCTATGCTGTATTTACATTACTTATTGTTTT
 64020

Figura 2: Seqüência parcial do gene da globina beta humana. As seqüências em vermelho caracterizam os exons e as em azul os introns, sendo que em negrito representam primeiro o sítio CAP e depois a região poli A. Os nucleotídeos em violeta representam os *primers* Beta 5'-a e Beta 5'-b e os em verde a posição dos *primers* Beta A-b, Beta C-b e Beta S-b.

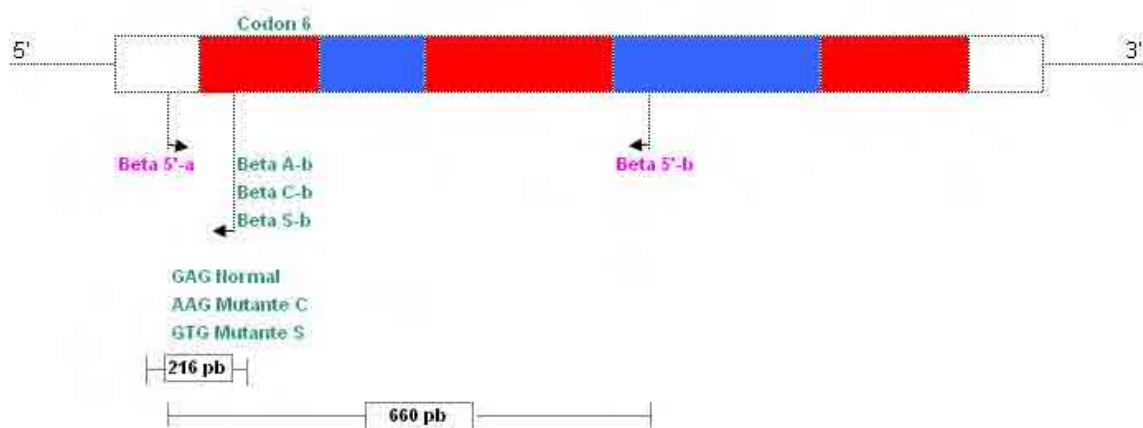


Figura 3: Representação esquemática da localização dos primers no gene da globina beta humana na caracterização molecular das hemoglobinas S, C e interações.

2.4 Identificação do genótipo AA, AD e DD

Na determinação genotípica a reação de PCR-AE foi realizada segundo Sanchaisuriya et al. (2004) modificado, utilizando-se 2 tubos para cada amostra de DNA. A reação ocorreu em um volume final de 100 μ L com 10 mmol/L de tampão, 0,2 mmol/L de cada dNTP; 3,0 mmol/L de $MgCl_2$; 1,0 U de Taq DNA polimerase (Gibco-BRL); 50,0 a 100,0 ng de DNA genômico e 0,2 μ mol/L de cada *primer*, a saber: G7, G30 e H5 no tubo 1 e no segundo tubo os *primers* G7, G40 e H5. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por 4 minutos, acrescida de 30 ciclos de 93°C por 45 segundos, 60°C 45 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 4 minutos. A análise dos produtos foi verificada em gel de agarose a 2,0%, evidenciadas com brometo de etídio e visualizadas sob transluminador.

```

61828
ACGATCTTCAATATGCTTACCAAGCTGTGATTCCAATATTACGTAATACACTTGCAAAGGAGGATGTTTTAGTAGCAATT
TGACTGATGGTATGGGGCCAAGAGATATATCTTAGAGGGAGGGCTGAGGGTTGAAGTCCAACCTCTAAGCCAGTGCCA
GAAGAGCCAAGGACAGGTACGGCTGTCACTACTTAGACCTCACCCCTGTGCTCGAGCCACACCCCTAGGGTTGGCCAATCTA
CTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTGCTTCT
GACACAACTGTTTCACTAGCAACAACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTG
TGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGGGCAGGTTGGTATCAAGTTACAAGACAGGTTAAGGA
GACCAATAGAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTGCTTATTGGTCT
ATTTTCCACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTACCCCTTGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTG
ATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAGAAAGTCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCCTGGCTCACCTG
GACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACACTGAGTGAGCTGCACCTGACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACTTCAGGGT
GAGTCTATGGGACCCCTGATGTTTTCTTCCCTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGG
GTACAGTTTAGAATGGGAAACAGACGAATGATTCATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTCTTTTATTGTGCTTT
CATAACAATTGTTTTCTTTGTTAATTCTGCTTTTTTTTTCTTCTCCGCAATTTTACTATTATACTTAATGCCTTAACA
TTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTCTGAGATACATTAAGTAACCTAAAAAAAACCTTACACAGTCTGCCTAGTACACTACTA
TTTGGAAATATATGTGTGCTTATTTGCATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTTCTTTTATTTTAAATTGATACATAATCATTATAC
ATATTTATGGGTTAAAGTGAATGTTTTAATATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAATTTTAAAAA
ATGCTTTCTTCTTTAATAATACTTTTTGTTTATCTTATTTCTAATACTTCCCTAATCTCTTTCTTTCAGGGCAATAATGATACA
ATGTATCATGCCTCTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAA
ATATTTCTGCATATAAATTTGTAACCTGATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCACTTCTGCTTTTA
TTTTATGGTTGGGATAAGGCTGATTATTTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGTAAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCTC
CCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCATCACTTTGGCAAGAATTCACCCACCAGTGCAAGGCTGC
CTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGCCCTGGCCACAAGTATCACTTAAGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCT
ATTAAGGTTCTTTGTTCCCTAAGTCCAACCTAACTAGGTTGATTTAAGGTTGATTTAAGGTTGATTTAAGGTTGATTTAAGGTTG
AATAAAAAACATTTATTTTCAATTGCAATGATGATTTTAAATTTTCTGAATATTTTACTAAAAAGGGAATGTGGGAGGTCAG
TGCATTTAAAACATAAAGAAATGAAGAGCTAGTTCAAACCTTGGGAAAATACACTATATCTTAAACTCCATGAAGAAGGTTG
AGGCTGCAAACAGCTAATGCACATTGGCAACAGCCCTGATGCCTATGCCTATTCATCCCTCAGAAAAGGATTCAAGTAGA
GGCTTGATTTGGAGGTTAAAGTTTTGCTATGCTGTATTTACATTACTTATTGTTTT
64020

```

Figura 4: Seqüência parcial do gene da globina beta humana. As seqüências em vermelho caracterizam os exons e as em azul os introns, sendo que em negrito representam primeiro o sítio CAP e depois a região poli A. Os nucleotídeos em laranja representam os *primers* G7 e H5 e os em azul petróleo a posição do G30 e G40.

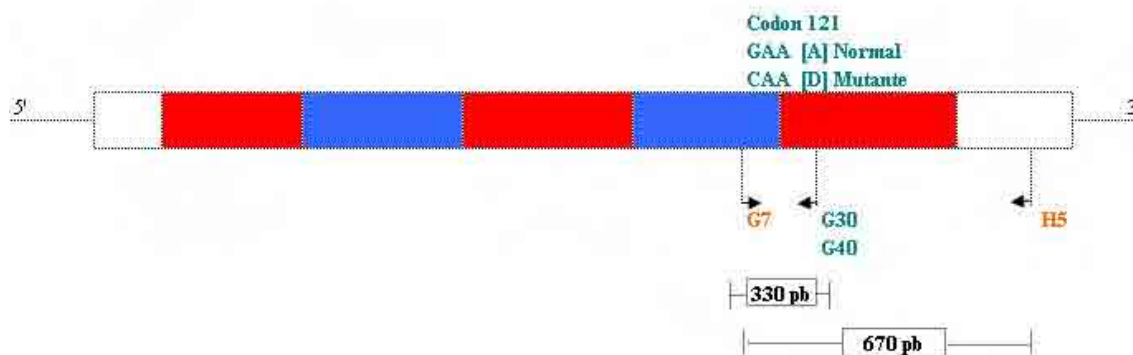


Figura 5: Representação esquemática da localização dos *primers* no gene da globina beta humana na caracterização molecular da hemoglobina D.

2.5 Identificação do genótipo SD

Para a identificação do genótipo SD realizou-se a reação de PCR multiplex em um único tubo, adaptada conforme Fischel-Ghodisian et al. (1990) e Sanchaisuriya et al. (2004). A reação ocorreu em um volume final de 100 μ L com 10 mmol/L de tampão, 0,2 mmol/L de cada dNTP; 3,0 mmol/L de $MgCl_2$; 1,25 U de Taq DNA polimerase (Gibco-BRL); 50,0 a 100,0 ng de DNA genômico e 0,2 μ mol/L de cada *primer*, a saber: Beta 5'-a, Beta Sb, G7, G40 e H5. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por 5 minutos, acrescida de 32 ciclos de 94°C por 45 segundos, 57°C 45 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 4 minutos. A análise dos produtos foi verificada em gel de agarose a 2,0%, evidenciadas com brometo de etídio e visualizadas sob transluminador.

```

61828
ACGATCTTCAATATGCTTACCAAGCTGTGATTCCAAATATTACGTAATACACTTGCAAAGGAGGATGTTTTAGTAGCAATT
TGTA CTGATGGTATGGGGCCAAGAGATATATCTTAGAGGGAGGGCTGAGGGTTTGAAGTCCAACCTCCTAAGCCAGTGCCA
GAAGAGCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCACCCTGTGCTCGAGCCACACCCTAGGGTTGGCCAATCTA
CTCCCAGGAGCAGGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCT
GACACAACTGTGTCTCACTAGCAACAAAACAGACACCATTGGTGCACTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCT
GTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGGGCAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTAAGG
AGACCAATAGAAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTGCTATTGGTC
TATTTTCCACCCTTAGCGTGGTGGTCTACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTG
ATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAGAAAGTCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCCTGGCTCACCTG
GACAACCCTCAAGGGCACCTTTGCCACTGAGTGAGCTGCACTGTGACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACTCAGGGT
GAGTCTATGGGACCCCTTGATGTTTTCTTCCCTTCTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGG
GTACAGTTTAGAATGGGAAACAGACGAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTTCTTTTATTGCTGTT
CATAACAATTGTTTTCTTTGTTAATTCTTGCCTTCTTTTTTTTCTTCTCCGCAATTTTACTATTATACTTAATGCCTTAACA
TTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTCTGAGATACATTAAGTAACCTTAAAAAAAACCTTACACAGTCTGCCTAGTACATTACTA
TTTGGAAATATGTGCTTATTGCATATTCATAATCCCTACTTTATTTCTTTTATTTTAATTGATACATAATCATTATAC
ATATTTATGGGTTAAAGTGAATGTTTTAATATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAAATTTAAAAA
ATGCTTTCTTTTAAATATACTTTTTGTTTATCTTATTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTCAGGGCAATAATGATACA
ATGTATCATGCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTCTGCATATAA
ATATTTCTGCATATAAATTGTAACTGATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTA
TTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTGCTAATCATGTTCATACCTCTTATCTTCTC
CCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAGAATTCACCCACCAGTGCAAGGCTGC
CTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGCCCTGGCCACAAGTATCACTAAGCTCGTTTCTTGCTGTCCAATTTCT
ATTAAGGTTCCTTTGTTCCCTAAGTCCAACTACTAACTGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCT
AATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAATGATGATTTAAATTATTTCTGAATATTTACTAAAAAGGAATGTGGGAGGTCAG
TGCATTTAAAACATAAAGAAATGAAGAGCTAGTTCAAACCTTGGGAAAATACACTATATCTTAAACTCCATGAAAGAAGGTG
AGGCTGCAAAACAGCTAATGCACATTGGCAACAGCCCTGATGCCTTATTCATCCCTCAGAAAAGGATTCAAGTAGA
GGCTTGATTTGGAGGTTAAAGTTTGCTATGCTGTATTTACATTACTTATTGTTTT
64020

```

Figura 6: Seqüência parcial do gene da globina beta humana. As seqüências em vermelho caracterizam os exons e as em azul os introns, sendo que em negrito representam primeiro o sítio CAP e depois a região poli A. Os nucleotídeos em violeta representam o *primer* Beta 5'-a, em verde a posição do *primer* Beta S-b, em laranja representam os *primers* G7 e H5 e os nucleotídeos em azul petróleo a posição do *primer* G40.

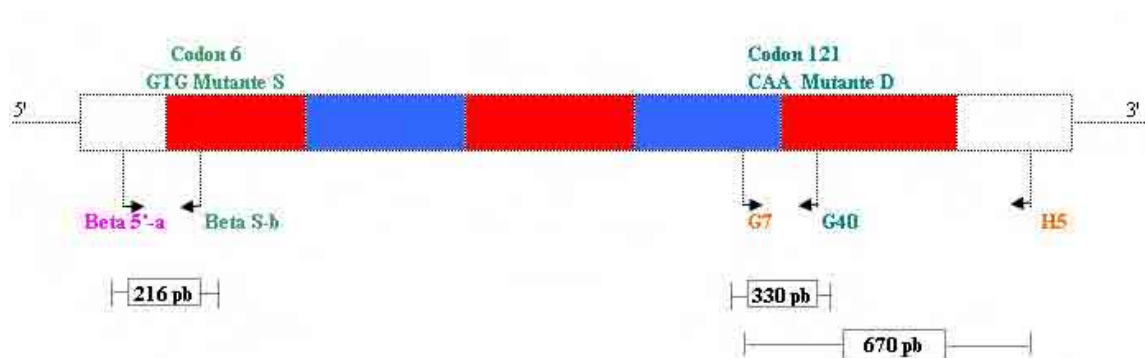


Figura 7: Representação esquemática da localização dos primers no gene da globina beta humana na caracterização molecular da interação SD.

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

Os genótipos IVS I-6 e IVS I-110 foram detectados através de protocolo adaptado de Costa et al. (1991) e Bienvenu et al. (1992) utilizando-se 2 tubos para

cada amostra de DNA. Para IVS I-6 a reação de PCR-AE foi realizada para um volume final de 100 μ L de reação: 10 mmol/L de tampão, 0,2 mmol/L de cada dNTP; 1,5 mmol/L de $MgCl_2$; 1,25 U de Taq DNA polimerase (Gibco-BRL); 50,0 a 100,0 ng de DNA genômico e 0,2 μ mol/L de cada *primer*, sendo no tubo 1 adicionados os *primers* PCO1, PCO9 e IVSI6W e no tubo 2 os *primers* PCO1, PCO9 e IVSI6M. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por 7 minutos, acrescida de 32 ciclos de 94°C por 50 segundos, 54°C por 50 segundos, 72°C por 50 segundos e uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

A reação de PCR-AE para IVS I-110 foi realizada nas mesmas condições acima com pequenas alterações: utilização de *primers* PCO1, PCO9 e TB110W no tubo 1 e PCO1, PCO9 e TB110M no segundo tubo; no processo de amplificação a temperatura de hibridização foi de 55°C, realizando-se 30 ciclos.

A análise dos produtos foi verificada em gel de agarose a 2%, evidenciadas com brometo de etídio e visualizadas sob transluminador.

```

61828
ACGATCTTCAATATGCTTACCAAGCTGTGATTCCAAATATTACGTAATACACTTGCAAAGGAGGATGTTTTAGTAGCAATT
TGTAAGGCAAGGACAGGTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCACCTGTGCTCGAGCCACACCCTAGGGTTGCCAATCTA
CTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTGCTTCT
GACACAACTGTTTCACTAGCACAAAACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCTTACTGCCCTG
TGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGTGGTGAGGCCCTGGGCAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTAAGGA
GACCAATAGAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTGCCTATTGGTCT
ATTTCCACCTTAGGCTGCTGGTGGTCTACCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTG
ATGCTGTTATGGGCAACCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAGAAAGTCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCCTGGCTCACCTG
GACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACTGAGTGAGCTGCACTGTGACAAGCTGCACGTGGATCTGAGAAGTCAAGGT
GAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTCCCTCTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGG
GTACAGTTTGAATGGGAAACAGACGAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTCTTTATTTGCTGTT
CATAACAATGTTTTCTTTGTTAATCTTGCCTTTCTTTTTTTCTTCCGCAATTTTACTATTATACTTAATGCCTTAACA
TTGTGATAACAAAAGGAAATATCTCGAGATACATTAAGTAACCTTAAAAAAAACCTTACACAGTCTGCCTAGTACATTA
TTTGGAAATATATGTGTGCTTATTGTCATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTCTTTTATTTTAAATTGATACATAATCATTATAC
ATATTTATGGGTTAAAGTGAATGTTTTAATATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAATTTAAAAA
ATGCTTTCTCTTTTAAATATACTTTTTGTTTATCTTATTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTCAAGGGCAATAATGATACA
ATGTATCATGCCTCTTGCACCTTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAA
ATATTTCTGCATATAAATGTAACTGATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCCTTTA
TTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGTAAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCTC
CCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATTCACCCCAAGTGCAGGCTGC
CTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGCCCTGGCCACAAGTATCACTTAAGCTCGCTTCTTGTGCTCAATTTCT
ATTAAAAGTTCCTTTGTTTCCCTAAGTCCAACTACTAAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCT
AATAAAAAACATTTATTTCATTGCAATGATGATTTAAATTTCTGAATATTTTACTAAAAAGGGAATGTGGGAGGTCAG
TGCATTTAAAAACATAAAGAATGAAGAGCTAGTTCAAACCTTGGGAAAAATACACTATATCTTAAACTCCATGAAAGAAGGTGA
GGCTGCAAACAGCTAATGCACATTGGCAACAGCCCTGATGCCTATGCCTTATTCATCCCTCAGAAAAGGATTCAAGTAGAG
GCTTGATTGGAGGTTAAAGTTTTGCTATGCTGTATTTTACATTAATTTGTTTT
64020

```

Figura 8: Seqüência parcial do gene da globina beta humana. As seqüências em vermelho caracterizam os exons e as em azul os introns, sendo que em negrito representam primeiro o sítio CAP e depois a região poli A. Os nucleotídeos em rosa representam os *primers* PCO1 e PCO9, em verde água os IVSI6W e IVSI6M e em verde brilhante os *primers* TB110W e TB110M.

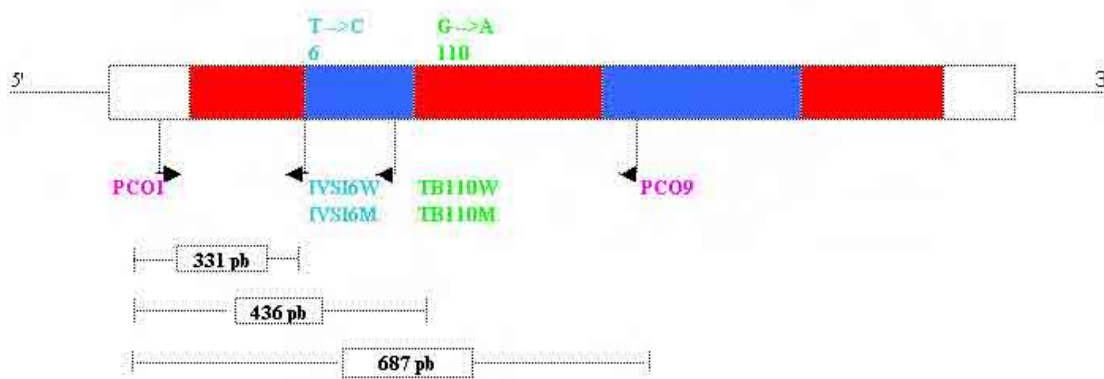


Figura 9: Representação esquemática da localização dos *primers* no gene da globina beta humana na caracterização molecular de talassemia beta IVS I-6 e IVS I-110.

2.7 Identificação dos genótipos IVS I-1 e CD 39

Os genótipos IVS I-1 e CD 39 foram detectados através de protocolo adaptado de Bienvenu et al. (1992) utilizando-se 2 tubos para cada amostra de DNA. Para CD 39, a reação de PCR-AE foi realizada para um volume final de 100 μ L de reação: 10 mmol/L de tampão, 0,2 mmol/L de cada dNTP; 1,5 mmol/L de $MgCl_2$; 1,25 U de Go Taq DNA polimerase (Promega); 50,0 a 100,0 ng de DNA genômico e 0,2 μ mol/L de cada *primer*, sendo no tubo 1 adicionados os *primers* PCO1, PCO9 e PS39W e no tubo 2 os *primers* PCO1, PCO9 e PS39M. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por 7 minutos, acrescida de 32 ciclos de 94°C por 50 segundos, 54°C por 50 segundos, 72°C por 50 segundos e uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

A reação de PCR-AE para IVS I-1 foi realizada nas mesmas condições acima com pequenas alterações: utilização de *primers* PCO1, PCO9 e IVS11W no tubo 1 e PCO1, PCO9 e IVS11M no segundo tubo; no processo de amplificação a temperatura de hibridização também foi de 54°C, realizando-se 35 ciclos.

A análise dos produtos foi verificada em gel de agarose a 2%, evidenciadas com brometo de etídio e visualizadas sob transluminador.

61828
 ACGATCTTCAATATGCTTACCAAGCTGTGATTCCAAATATTACGTAATACACTTGCAAAGGAGGATGTTTTAGTAGCAATT
 TGTAAGTATGGTATGGGGCCAAGAGATATATCTTAGAGGGAGGGCTGAGGGTTTGAA**GTCCA**ACTCT**TAAGCCAGT**GCCA
 GAAGAGCCAAGGACAGGTACGGCTGTGCATCACTTAGACCTCACCTGTGCTCGAGCCACACCCTAGGGTTGGCCAATCTA
 CTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTG**CTTACATTGCTTCT**
GACACAACTGT**TTCACTAGCAACA**ACAGAC**ACCATTGGTG**CACCT**GACTCCTG**AGGAGAA**GTCTGCCGTTACTGCCCTG**
TGGGGCAAGGT**GAA**CGT**GGATGA**AGTT**GTGGT**GAGGCC**CTGGCAG**GGT**GGTATCA**AG**GTACA**AGACAG**GT**TA**AGGA**
 GACCAATAGAAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTGCCTATTGGTCT
 ATTTCCACCCTTAG**CGCTGGTGGTCTACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGT**CTTTGGGGATCTGTCCACTCTG
 ATGCTGTTATGGGCAACCTTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAGAAAGT**GCTCGGTGCCTTTAGT**GATGGCCTGGCTCACCTG
 GACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCCACTGAGTGAGCTGCACTGTGACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGA**ACTCAGGGT**
 G**AGTCTATGGGAC**CTT**GATG**TTTTCTTTCCCTTCTTTCTATGGTTAAGTTCATGTGCATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGG
 GTACAGTTTAGAATGGGAAACAGACGAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTTCTTTTATTGCTGT
 CATAACAATTGTTTTCTTTGTTAATTCTTGCCTTTCTTTTTTTCTTCTCCGCAATTTTACTATTATACTTAATGCCTTAACA
 TTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTCTGAGATACATTAAGTAACTTAAAAAAAACCTTACACAGTCTGCCTAGTACATTA
 TTTGGAATATATGTGCTTATTGCATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTCTTTTATTTTAAATGATACATAATCATTATAC
 ATATTTATGGGTTAAAGTGAATGTTTTAATATGTGTACACATTTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAATTTAAAAA
 ATGCTTTCTTTTAAATATACTTTTTGTTTATCTTATTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTAGGGCAATAATGATACA
 ATGTATCATGCCTCTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATA
 ATATTTCTGCATATAAATTGTAACGTATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCACTTCTGCTTTTA
 TTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCTC
 CCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAA**TTACACCCAC**AGTGCAGGCTGC
 CTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGCCCTGGCCACAAGTATCA**CTAAGCTCG**TTTCTT**GCTGTCCA**ATTTCT
 ATTAAGGTTCTTTTGGTCCCTAAGTCCAACTACTAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCT
 AATAAAAAACATTTATTTTCAATGCAATGATGATTTAAATTATTTCTGAATATTTACTAAAAAGGAATGTGGGAGGTCAG
 TGCATTTAAAACATAAAGAAATGAAGAGCTAGTTCAAACCTTTGGGAAAATACACTATATCTTAAACTCCATGAAAGAAGGTGA
 GGCTGCAAACAGCTAATGCACATTGGCAACAGCCCTGATGCCTATGCCTTATTTCATCCCTCAGAAAAGGATTCAAGTAGAG
 GCTTGATTTGGAGGTTAAAGTTTTGCTATGCTGTATTTACATTACTTATTGTTTT
 64020

Figura 10: Sequência parcial do gene da globina beta humana. As seqüências em vermelho caracterizam os exons e as em azul os introns, sendo que em negrito representam primeiro o sítio CAP e depois a região poli A. Os nucleotídeos em rosa representam os *primers* PCO1 e PCO9, em verde os *primers* IVS1W e IVS1M e em vermelho escuro PS39W e PS39M.

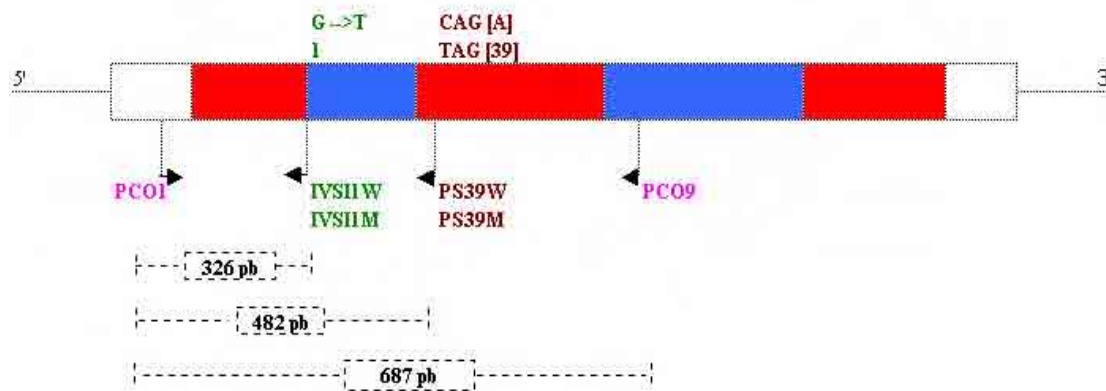


Figura 11: Representação esquemática da localização dos primers no gene da globina beta humana na caracterização molecular de talassemia beta IVS I-1 e CD 39.

2.8 Identificação dos genótipos C/ β^+ talassemia e S/ β^+ talassemia

Os genótipos C/ β^+ talassemia e S/ β^+ talassemia foram detectados através de protocolo adaptado de Fischel-Ghodisian et al. (1990) e Bienvenu et al. (1992) utilizando-se 2 tubos para cada amostra de DNA. A reação de PCR foi

realizada para um volume final de 100 μ L de reação: 10 mmol/L de tampão, 0,2 mmol/L de cada dNTP; 2,5 mmol/L de $MgCl_2$; 1,25 U de Go Taq DNA polimerase (Promega); 50,0 a 100,0 ng de DNA genômico e 0,2 μ mol/L de cada *primer*, sendo no tubo 1 adicionados os *primers* PCO1, PCO9, TB110M e Beta C-b e no tubo 2 os mesmos *primers*, com a substituição do Beta C-b pelo Beta S-b. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por 5 minutos, acrescida de 32 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C também 1 minuto seguida de uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para a identificação da interação das hemoglobinas variantes com a talassemia beta IVSI-6, a reação de PCR-AE foi realizada nas mesmas condições acima com pequenas alterações: utilização de *primers* PCO1, PCO9, IVSI6M e Beta C-b e PCO1, PCO9, IVSI6M e Beta S-b no segundo tubo; no processo de amplificação, a temperatura de hibridização foi de 54°C, realizando-se também 32 ciclos. A análise dos produtos foi verificada em gel de agarose a 2%, evidenciadas com brometo de etídio e visualizadas sob transluminador.

```

61828
ACGATCTCAATATGCTTACCAAGCTGTGATTCCAAATATTACGTAATACACTTGCAAAGGAGGATGTTTTAGTAGCAATT
TGTACTGATGGTATGGGGCCAAGAGATATATCTTAGAGGGAGGGCTGAGGGTTTGAAGTCCAACTCTTAAGCCAGTGCCA
GAAGAGCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCACCCCTGTGCTCGAGCCACACCCTAGGGTTGGCCAATCTA
CTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTGCTTCT
GACACAACTGTGTTCACTAGCAACAACAGACACCATGGTGCACTCTCTGAGGAGAAGCTGCCGTTACTGCCCT
GTGGGGCAAGGTGAACTGGATGAAGTTGTGGTGAGGGCCCTGGGCAGTTGGTATCAAGGTTACAAGCAGGTTTAAGGG
AGACCAATAGAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTGCCTATTGGTC
TATTTTCCACCCTTAGGGCTGCTGGTGGTCTACCCTTGAGCCAGAGTTCTTTGAGTCTTTGGGGATCTGTCCACTCT
GATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAGAAAGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCCTGGCTCACT
GGACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACTGAGTGAGCTGCACTGTGACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACTCAGGG
TGAGCTATGGGACCTTGATGTTTTCTTTCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGAGAAGTAACAG
GGTACAGTTTAGAATGGGAACAGACGAATGATTGCATCAGTGGAAGTCCAGGATCGTTTTAGTTCTTTTATTGGCTG
TTCATAACAATTTGTTTTCTTTGTTTAAATCTTGCTTTCTTTTTTTTTCTTCCGCAATTTTTACTATTATACTTAATGCCTAA
CATTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTCTGAGATACATTAAGTAACCTTAAAAAAAACCTTACACAGTCTGCCTAGTACATTAC
TATTTGGAATATATGTGTGCTTATTTGCATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTTCTTTTATTTTAAATTGATACATAATCATTAT
ACATATTTATGGGTTAAAGTGAATGTTTTAATATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAATTTTAA
AAAATGCTTCTCTTTAATACTTTTTGTTTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTCTTTCAGGGCAATAATGAT
ACAATGTATCATGCCCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATA
TAAATATTTCTGCATAAAATTTGAACTGATGAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTT
TTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTCCATACCTCTTATCTTC
CTCCACAGCTCCTGGGCAAGCTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGATTCACCCACCAGTGCAGGC
TGCCTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGGCTAATGCCTGGCCACAAGTATCACTAAGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATT
TCTATTAAAAGTTTCTTTGTTCCTAAGTCCAACTACTAAACTTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCACTGGATTCTG
CCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAATGATGATTTTAAATTTATTTCTGAATATTTTACTAAAAAGGGAATGTTGGGAGGT
CAGTGCATTTAAACATAAAAGAAATGAAGAGCTAGTTCAAACCTTGGGAAAAATACACTATATCTTAACTCCATGAAAGAAGG
TGAGGCTGCAACAGCTAATGCACATTGGCAACAGCCCTGATGCCTATGCCTTATTCATCCCTCAGAAAAGGATTCAAGTA
GAGCCTTGATTTGGAGGTTAAAGTTTTGCTATGCTGATTTTACATTACTTATTGTTTT
64020

```

Figura 12: Seqüência parcial do gene da globina beta humana. As seqüências em vermelho caracterizam os exons e as em azul os introns, sendo que em negrito representam primeiro o sítio CAP e depois a região poli A. Os nucleotídeos em rosa representam os *primers* PCO1 e PCO9, em verde o Beta C-b e Beta S-b, em verde água IVSI6M e em verde brilhante o *primer* TB110M.

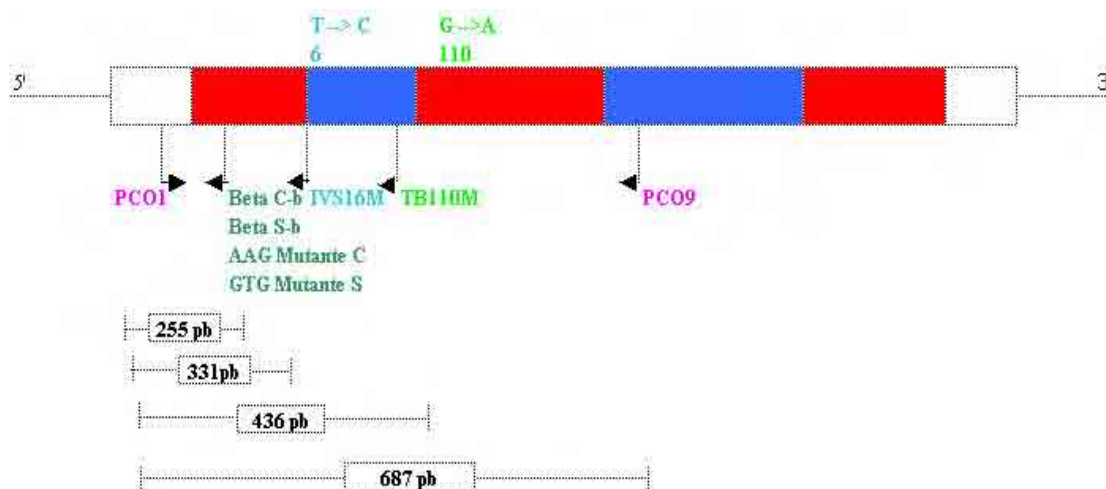


Figura 13: Representação esquemática da localização dos *primers* no gene da globina beta humana na caracterização molecular da interação C/ β^+ talassemia e S/ β^+ talassemia.

2.9 Identificação do genótipo Lepore

Os genótipos Lepore foram detectados por PCR multiplex através do protocolo adaptado de Craig et al. (1994) em um único tubo para cada amostra de DNA. A reação foi realizada em um volume final de 100 μ L utilizando-se o Kit PCR Master Mix, 50-100 ng de DNA genômico e 0,2 μ mol/L dos *primers* E1, E2 e E3. A amplificação foi realizada por desnaturação prévia de 94°C por 5 minutos, acrescida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

A análise dos produtos foi verificada em gel de agarose a 1,5%, evidenciadas com brometo de etídio e visualizadas sob transluminador.

61180 Gene Globina Beta

ATTTGTATTTTGGACTGCATTAAGAGGTCTCTAGTTTTTATCTCTTGTTCCTCCAAAACCTAATAAGTAACCTAATGCACAGAGC
 ACATTGATTTGTATTTATTCTATTTTAGACATAATTTATTAGCATGCATGAGCAAATTAAGAAAAACAACAACAAATGAATGC
 ATATATATGTATATGTATGTGTATATACACATATATATATATATTTTTTTCTTTTCTTACCAGAAGGTTTTAATCCAAATA
 AGGAGAAGATATGCTTAGAACTGAGGTAGAGTTTTATCCATTCTGTCTGTAAAGTATTTTGCATATTTCTGGAGACGCAGGA
 AGAGATCCATCTACATATCCCAAAGCTGAATTATGGTAGACAAAGCTCTCCACTTTTAGTGATCAATTTCTTATTTTGTGTA
 ATAAGAAAATTGGGAAAA**CGATCTTCAATATGCTTACCAAG**CTGTGATTCCAATATTACGTAATACACTTGCAAAGGAGG
 ATGTTTTTAGTAGCAATTTGACTGATGGTATGGGGCCAAGAGATATATCTTAGAGGGAGGGCTGAGGGTTTGAAGTCCAA
 CTCTAAGCCAGTGCCAGAAGAGCCAAGGACAGGTACGGCTGTGCATCACTTAGACCTCACCTGTGCTCGAGCCACACCC
 TAGGGTTGGCCAATCTACTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGGGCATAAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTA
 TTG**CTTACATTTGCTTCTGACACA**ACTGT**TTCACTAGCAACAACAGACACC**ATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGT
 CTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGGGCGCTGGGCAGGTTGGTATCAAGGTTA
 CAAGACAGGTTTAAAGGAGACCAATAGAAAAGTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATAGGCCACTGACT
 TCTCTGCCTATTGGTCTATTTTCCACCCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCTTTGGG
 GATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAGAAAGTGCCTGGTGCCTTTAGTAT
 GGCCTGGCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACTGAGTGCAGTGCAGTGCAGCAAGCTGCACGTGGATCC
 TGAGAACTTCAGGAGTGAGTCTATGGGACCCCTGATGTTTTTCCCTCTTTTCTATGGTTAAGTTTCATAGGAAGG
 GGAGAAGTAACAGGGTACAGTT**AGAAATGGGAAACAGACGAAT**GATTGCATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGT
 TTCTTTTATTTGCTGTTCAACAATGTTTTCTTTGTTTAAATCTTCTGCTTTCTTTTTTTCTTCTCCGCAATTTTACTATTAT
 ACTTAATGCCTTAACATTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTCTGAGATACATTAAGTAACTAAAAAAAACCTTACACAGTCT
 GCCTAGTACATTACTATTTGGAATATATGTGTGCTTATTTGCATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTTCTTTTATTTTAAATTGA
 TACATAATCATTATACATATTTATGGGTTAAAGTGAATGTTTTAATATGTGTACACATATTGACCAAAATCAGGGTAATTTTGC
 ATTTGTAATTTAAAAAATGCTTTCTTCTTTAATAACTTTTTGTTTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTCA
 GGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCA
 ATATTTCTGCATATAAATTTCTGCATATAAATTGTAAGTGTGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGC
 TACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTGGGATAAAGGCTGGATTTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGTAAATCATGTTTCAT
 ACCTCTTATCTTCTCCACAG**CTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCATCACTTTGGCAAGAATCACCCC**
ACCAGTGCAGGCTGCCTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGGCTAATGCCCTGGCCACAAGTATCACTAAGCTCGCTTTC
TTGCTGTCCAATTTCTATTAAGGTTCCCTTTGTTCCCTAAGTCCAACTACTAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAG
CATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAATGATGATTTAAATTTTCTGAATATTTTACTAAAAAGGG
 AATGTGGGAGGTCAAGTGCATTTAAAAACATAAAGAAATGAAGAGCTAGTTCAAACCTTGGGAAAATACACTATATCTTAAACT
 CATGAAAGAAGGTGAGGCTGCAAACAGCTAATGCACATTGGCAACAGCCCTGATGCCTATGCCTTATTCATCCCTCAGAAA
 AGGATTCAAGTAGAGGCTTGATTTGGAGGTTAAAGTTTTGCTATGCTGATTTTACATTACTTATTGTTTT
 64020

Figura 14: Sequência parcial do gene da globina beta humana. As seqüências em vermelho caracterizam os exons e as em azul os introns, sendo que em negrito representam primeiro o sítio CAP e depois a região poli A. Os nucleotídeos em violeta representam o *primer* E2 e em lima o *primer* E3.

A seqüência parcial de nucleotídeos referente ao gene *Lepore-Baltimore delta beta fusion (crossover region)* utilizada para a amplificação do fragmento de interesse está depositada no GenBank sob as coordenadas S41503, apresentando 84 pb.

54090 Gene Globina Delta
 TGATTTTATCTGTCATTAATAAATGTTAACCTTAAAAATTCATGTTTCCAGAACCTATTTCAATAACTGGTAAATAAACACTATTCA
 TTTTTTAAATATTCTTTTAAATGGATATTTTCAATATAATAAAAAATTAGAGTTTTATTATAGGAAGAATTTACCAAAAAGAAG
 GAGGAAGCAAGCAAGTTTAACTGCAGCAATAGTTGTCCATTCCAACCTCTCAAAAATCCCTTGGAGACAAAACTCTAGAG
 GCAAAGAAGAACTTTATATTGAGTCAACTTGTAAAAACATCTGCTTTTAGATAAGTTTTCTTAGTATAAAGTGACAGAAACAA
 ATAAGTTAAACTCTAAGATACATTCCACTATATTAGCCTAAAAACACTTCTGCAAAAAATGAAACTAGGAGGATTTTTAGAAA
 CAACTGCTGAAAGAGATGCGGTGGGGAGATATGCAGAGGAGAACAGGGTTTCTGAGTCAAG**BACACACATGACAGAACAG**
CCAATCTCAGGGCAAGTTAAGGGAATAGTGAATGAAGGTTCATTTTCAATCTCACAAACTAATGAAACCCTGCTTATCTT
 AAACCAACCTGCTCACTGGAGCAGGGAGGACAGGACAGGACATAAAAGGCAGGGCAGAGTGCAGTGTGCTT**ACACTTTCT**
TCTGACATAACAGTGTTCACTAGCAACCTCAAAACAGACACC**ATGGTGCATCTGACTCCTGAGGAGAAGACTGCTGTCAAT**
GCCCTGTGGGGCAAAGTGAACGTGGATGCAGTTGGTGGTGAGGCCCTGGGCAG**GTGGTATCAAGGTTATAAGAGAGGC**
TCAAGGAGGCAAATGGAAACTGGGCATGTGTAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTGTCCCTT
GGGCTGTTTTCTACCCCTCAG**ATTACTGGTGGTCTAC**CCCTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCCTTGGGGATCTGCCTC
TCCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAAGGCT**CATGGCAAGAAGGTGCTAGGTGCCTTTAGTGATGGCCTGGCT**
CACCTGGACAACCTCAAGGGCAC////**CTTTGCCACACTGAGT**GAGCTGCACTGTGACAAGCTGCAGTGGATCCTGAGAA
CTTCAGGGTGAGTCTATGGGACCCTTGATGT**TAGAATGGGAAACAGACGAATG**ATTGCATCAGTGTGGAATTTCTTTCCC
 CTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACAGTTGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTTCTT
 TTATTTGCTGTTACATAACAATTGTTTTCTTTGTTAATTCTTGCTTTCTTTTTTTTCTCTCCGCAATTTTACTATTATACTT
 AATGCCTTAACATTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTCTGAGATACATTAAGTAACTAAAAAAAACCTTTACACAGTCTGCC
 TAGTACATTACTATTTGGAATATATGTGTGCTTATTTGCATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTTCTTTTATTTTAAATTGATA
 CATAATCATTATACATAATTTATGGGTTAAAGTGAATGTTTTAATATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCAT
 TTGTAATTTAAAAAATGCTTTCTCTTTAATATACTTTTTGTTTATCTTATTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTCAG
 GGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCA
 ATATTTCTGCATATAAATTTCTGCATATAAATTGTAAGTGAAGGTTTCAATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAG
 CTACCATTCTGCTTTATTTTATGGTTGGGATAAAGGCTGGATTAATCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGTAAATCATGTTCA
 TACCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATTCACCC
CACCAGTGCAGGCTGCCTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGGCTAATGCCCTGGCCACAAGTATCACTAAGCTCGCTTT
CTTGCTGTTCCAATTTCTATTAAGGTTCC**TTTGTCC**TAAGTCCA**ACTACTAA**ACTGGGGGATATTATGAAGGGC**TTGA**
GCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAATGATGTATTTAAATTTTCTGAATATTTTACTAAAAAG
 GGAATGTGGGAGGTCAGTGCATTTAAACATAAAGAAATGAAGAGCTAGTTCAAACCTTGGGAAAATACACTATATCTTAAA
 CTCCATGAAAGAAGGTGAGGCTGCAACAGCTAATGCACATTGGCAACAGCCCTGATGCCTATGCCTTATTCATCCCTCAG
 AAAAGGATTCAAAGTAGAGGCTTGATTTGGAGGTTAAAGTTTTGCTATGCTGTATTTTACATTACTTATTGTTTT
 64020 Gene Globina Beta

Figura 15: Sequência parcial do gene híbrido da globina delta e beta humana. As seqüências em vermelho caracterizam os exons e as em azul os introns, sendo que em negrito representam primeiro o sítio CAP e depois a região poli A. Os nucleotídeos em marrom representam a fusão dos genes delta e beta (//// = ponto de fusão), em azul escuro o *primer* E1 e em lima o *primer* E3.

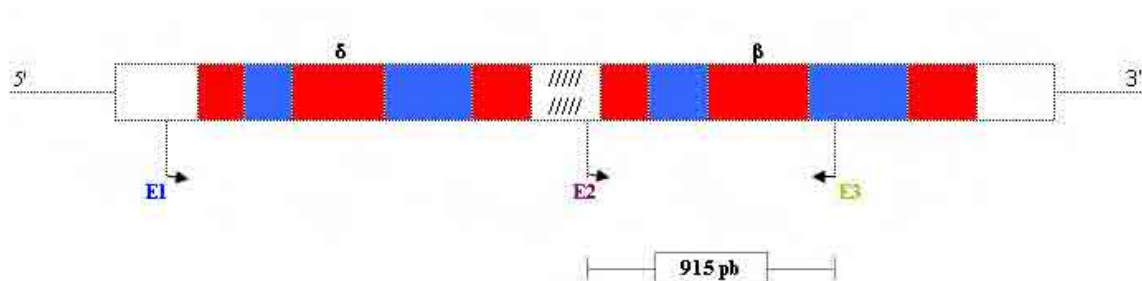


Figura 16: Representação esquemática da localização dos primers no gene da globina delta e beta humana na caracterização molecular da hemoglobina Lepore.

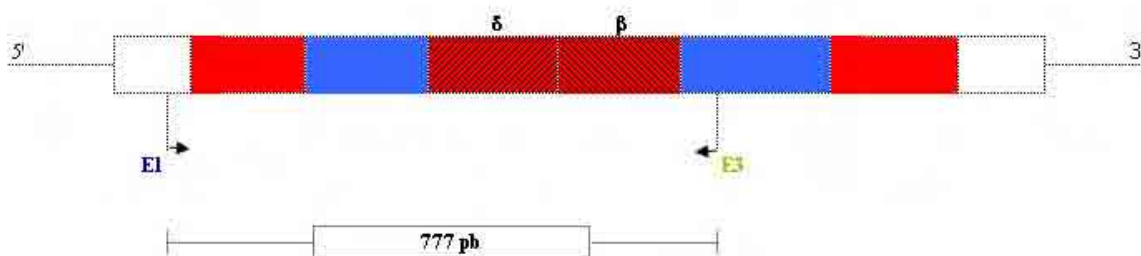


Figura 17: Representação esquemática da localização dos *primers* na fusão dos genes das globinas delta e beta humana na caracterização molecular da hemoglobina Lepore.

2.10 Identificação dos genótipos de talassemia alfa

Os genótipos mais comuns de talassemia alfa observados na população brasileira (deleção $\alpha^{3,7}$ e $\alpha^{4,2}$) foram padronizados por PCR multiplex em um único tubo, seguindo os protocolos de Chong et al. (2000) e Tan et al. (2001). A reação foi realizada para um volume final de 100 μ L acrescentando 20 mmol/L de tampão da PCR 10X; 0,2 mmol/L de cada dNTP; 2,5 U de Go Taq DNA polimerase (Promega); 50,0 a 100,0 ng de DNA genômico, 0,5 μ mol/L de cada um dos *primers* LIS1F, LIS1R (utilizado na verificação da funcionalidade da reação), 0,2 μ mol/L de ALFA2/3,7F, 3,7R e ALFA2R (para a deleção $\alpha^{3,7}$) e 0,5 μ mol/L dos *primers* 4,2F e 4,2R (para a deleção $\alpha^{4,2}$). O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 96°C por 15 minutos, acrescida de 30 ciclos de 98°C por 45 segundos, 60°C por 1 minuto e 30 segundos, 72°C por 2 minutos e 15 segundos seguida de uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

A análise dos produtos foi verificada em gel de agarose a 1%, evidenciadas com brometo de etídio e visualizadas sob transluminador.

A seqüência parcial de nucleotídeos referente ao gene *Human alfa globin* utilizada para a amplificação do fragmento de interesse está depositada no GenBank sob as coordenadas *Locus/HUMHBA4*, sendo que o gene completo possui 12.847 pb (Figuras 18 a 21).

3033
GGTGACCTAGGCCTGCCACACCCCTTCCCGGTTACCCATGTGGTGCCTCCATGGACA...(2.500nt)...TCCAGCGTGCGCC
GAGCCTGGCCAAACCATCACTTTTCATGAGCAGGGATGCACCCACTGGACTCCTGGACCTCCACCCCTCCCGCTCGCCAA
BTCCACCCCTTCTCTCTCACCCACATCCCTCACCTACATTCTGCAACACAGGGGCTTCTCTCCCTGTCTTTCCCTA
CCCAGAGCCAGGTTTGTATCTGTTTACAACCAAGTATTACCTAGCAAGTCTTCCATCAGATAGCATTGGAGAGCTGGGG
GTGTACACAGTGAACCCACGACCTCTAGGCCAGTGGGAGTCAATCACACAAACTGTGAGTCCATGACTTGGGGCTTAGCC
AGTACCCACCACCCACCGCCACCCACACAACCCCGGTAGAGGAGTCTGAATCTGGAGCCGCCCCAGCCAGCCCGG
TGCTTTTTGCGCTCTGGTGTGTTGTTCCCTTCCCGGTGCCTGTCAAGCACACTAGTACTCGCCAGAGGGAAAGGGA
GCTGCAGGAAGGCTGGAGAGCAGGAGGGGCTGCGCAGAAATCTTTGAGTTCATGGCCAGGGCGTCCGG
GTGCGCGCATTCTCTCCGCCAGGATTGGGCGAAGCCCTCCGGCTCGCACTCGCTCGCCCGTGTGTTCCCGATCCC
GCTGGAGTGCATGCGCGTCCAGCGCTGCCAGCCGGGGCGGGGGTGCAGGCTGACTTTCTCCCTCGCTAGGGACGCT
CCGGCGCCGAAAGGAAAGGGTGGCGCTGCGCTCCGGGGTGCACGAGCCGACAGCGCCGACCCCAACGGCCCGG
CGCCAGCGCCCTACCGCCCTGCCGGGGCAGCGGATGGGCGGAGTGGAGTGGCGGGTGGAGGTTGGAGACGTC
CTGGCCCCCGCCCGCTGCACCCAGGGGAGGCCAGCCCGCCGCGCCCGCCCGCGCAGGCCCGCCCGGGACTC
CCTGCGGTCCAGGCCCGCCCGGCTCCGCGCCAGCCAAATGACGCGCCCGCCGGCCGGCTGCCCGCCGCCCA
AGCATAAACCTGGCGCTCGCGGCCGCACTTCTGTCGCCACAGACTCAGAGAGAACCACATGTTGCTGTCT
CCTGGCAACAGCAACGCTCAAGGCGCGCTGGGGTAAGGTCGGCGCGCACGCTGGCGAGTATGGTGGCGGCGCTG
GAGAGGTGAGGCTCCCTCCCTGCTCCGACCCGGGCTCCTGCGCCGCCGGACCCACAGGCCACCCCTAACCGTCTG
CCCCGACCCAAACCCACCCCTCACTCTGCTTCTCCCGCAGGATGTTCTGTCTTCCCACCAAGACCTACTTCC
CGCACTTCGACTGAGCCACGGCTCTGCCAGGTTAAGGGCCACGGCAAGAAGGTGGCCGACGCCCTGACCAACGCGT
GGCGCAGTGGACGACATGCCAACGCGCTGTCCGCCCTGAGCGACCTGCACGCGCACAGCTTCGGGTGGACCCGGT
CAACTTCAAGGTGAGCGCGCGCCGGGAGCGATCTGGTTCGAGGGCGAGATGGCGCTTCTCTCAGGGCAGAGGAT
CACGGGGTTCGGGAGGTGTAGCGCAGGGCGGGCTGCGGGCTGGCCGCACTGACCCCTTCTCTGCACAGCTCC
TAAGCCACTGCTGTGGTGAACCTGCGCCGCCACCTCCCGCCGAGTTACCCCTCGGTGCACGCTCCCTGGACAA
GTTCTGTGCTTGTGAGCACCGTGTGACTCCAAATACCGTAAAGCTGGAGCCTCGGTAGCCGTTCTCTGCCGAT
GGGCTCCCAACGGGCCCTCCTCCCTCCTTGCACCGGAAATGCAACAAATGGAGGTGTTACCTGTCTCAGACCAAGGCTCTGTCA
GCTGCATGGGGTGGGAGGGAGAAGTGCAGGGAGTATGGGAGGGGAAGCTGAGGTGGGCTGCTCAAGAGAAGGTGC
TGAACCATCCCTGTCTGAGAGGTGCCAGGCCTGCAGGCAGTGGCTCAGAAGCTGGGGAGGAGAGGATCCAGGGT
TCTACTCAGGGAGTCCAGCATCGCCACCCCTCTTGAATCTCCCTGGTTGAACCCAGTTAACATACGCTCTCCATCAAAA
CAAAACGAAACAAACAAACTAGCAAAATAGCCTGTCCCCAGTGCAGAGTGCAGGTGCCAGAACATTTCTCTCATCCCA
CCTTCTGCCAGAGGGTAGGTGGCTGGAGTGAAGGTGCTGGCCCTACTCACACTTCTGTGTACGGTGACCCCTGAGA
GCAGCCAGTCAAGTGGGAAGGAGGAAGGGGCTGGATGTCTCAGAGCCGGCAGCCACACTAGGGAGACTTTCAGCA
GAGCCTTTGCGGCTTACTCCTGCAGTCTCCTGAGTTTGAAGTGTGATTGCAACTACTGTTGCCAGCCAGCTGAG
CTCCAGCTAATTGCCCCACCCAGGGCTCTGGGACCTCCTGGTGTCTTCTGCTTCTGCTGCCAGCAACTCTGGAAC
GTCCCTGTCCCGGTGCTGAAGTCTGGAATCCATGCTGGGAAGTTGCACAGCCATCTGGCTCTCAGCCAGCCTAGAA
CATGAGCAGACTTCAACCCAGTCCCTGCCACAGCAAGCTCCCTCCACACTCAGACTGAGTGGATGAGCTTTGG
GGAGGTGGAGAGGACCCCTGTACCCGCTTCTCCTTGTGACATGGACTCTCTGAATTGTTGGGGAGTCCCTCCCTCT
CCACCACCCGCTCTTCTGCGCTCAGCCAGAGCATTGTTATTTAGCAGAAAACACTTTAAAAATAAATAAAATCCG
ACAGGCACGGTGGCTCACGCCTGAATCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGTGGGAGGATCACCTGAGTTCGGGAGTTTG
AGACCACCTGATCAACATGTAGAAAACCCATCTATACTAAAAATCAAAATCAGCCGGCATGGTGGCCCATGCCTGTAA
ACCCACTACTCCGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCAATTTAACCAAGGAGGCAGAGTTGCATGAGCTACACACCA
TTGCACTCCAGCCTGGAACAAACAGCGAAACTCGCCTCAAAAAAAAAAAGCCCCACATCTTATCTTTTTTTTCTTC
AGCTGTGGGCAGAGTCAGAAAGTCAAGAGGGGTGGCAGACAGGGAGGGGAAATGAGAAGATCCAAACGGGGGAAGCA
TTGCTAAGCTGGTCCGAGCTACTTCTTCTGCCCCAAGGCAGCTTACCCTGGCTTGTCTCTGGAGTCCCTCCCTCT
CTGAGTAAGGGCTGGGAGACAGGGCAGGGAGCAGGCTGAAGGGTGTGACCTGATGCACTCCTCAAAGCAGATCTTC
TGCCAGACCCCAAGAAATGACTTATCAGTATTTCTCAGGCTGTTTCTCCTCAGTACCATCCCCCAAAAAACATCACTT
TTCATGCACAGGGATGCACCCACTGGCACTCCTGCACCTCCACCCCTCCCAAGTCCACCCCTT...(1.000nt)...GGGAG
TGGAGTGGCGGGTGGAGGGTGGAGACGTCTGGCCCGCCCGCGCTGCACCCCAAGGGAGCCGAGCCGAGCCCGCC
CGGCCCGCGCAGGCCCGCCCGGGACTCCCTGCGGTCCAGGCCGCGCCCGGGCTCCGCGCCAGCCAATGAGCGC
CGCCCGCCGGGCTGCCCGCCCGCCCAAGCAATAAACCTGGCGCGCTCGCGGCCGCACTTCTGGTCCCCACA
GACTCAGAGAAACCCACATGTTGCTGTCTCCTGCCGACAAGCAACGCTCAAGGCCGCTGGGTAAGGTGGCGG
CACGCTGGCGAGTATGGTGGCGAGGCCCTGGAGAGGTGAGGCTCCCTCCCTGCTCCGACCCGGGCTCCTCGCCGCC
CGAACCCACAGGCCACCCCTAACCGTCTGGCCCGGACCCAAACCCACCCCTCACTCTGCTTCTCCCGCAGGATGTT
CCTGTCTTCCCACCAAGACCTACTTCCCGCACTTGCAGCTGAGCCACGGCTGTGCCAGGTTAAGGGCCAGGCA
AGAAGGTGGCCGACGCGCTGACCAACGCGCTGGCGCACAGTGGACGACATGCCAACGCGCTGTCCGCGCTGAGCCACT
GCACGCGCACAGCTTCGGGTGGACCCGGTCAACTTCAAGGTGAGCGGGCGGGCCGGGAGCGATCTGGGTGAGGGGCG
AGATGGCGCTTCTCGCAGGGCAGAGGATCACGCGGGTTCGGGGAGGTGATAGCGCAGGCGGCGGGCTGCGGGCTGG
CCCTGGCCCACTGACCCCTTCTCTGCACAGCTCAAGCCACTGCCTGCTGGTACCCTGGCCGCCCAACTCCCGC
CGAGTTCACCCCTGCGGTGCACGCTCCCTGGACAAGTTCTGGCTTCTGTGAGCACCGTGCACCTCCAAATACCGTT
AAAGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGGCCCTTGGGCTCCCCAGCCCTCCTCCCTTCTCTGCACCCGTACCCC
CGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCAGCCTGTGTGCTGAGTTTTTTTCTCAGAAACGTGCCAGATGGGC
GTGGACAGCAGCTGGGACACACATGGCTAGAACCCTCTGCGAGTGGATAGGGTAGGAAAGGCAGGGGCGGAGGAGG
GGATGGAGGAGGAAAGTGGAGCCACCGGAAGTCCAGCTGGAAAAAAGCTGGAGCCTAGAGTGTGGTGGAGGATGCATT
TGCTCTT
11533

Figura 18: Seqüência parcial dos genes das globinas alfa 2 e alfa 1 humana. As seqüências em vermelho caracterizam os exons e as em azul os introns. Os nucleotídeos em verde representam o *primer* 4,2F, em azul o Alfa2/3,7F, em laranja claro o Alfa2R, azul petróleo o *primer* 4,2R, verde brilhante 3,7R e entre parênteses os nucleotídeos suprimidos para melhor expressão da figura.

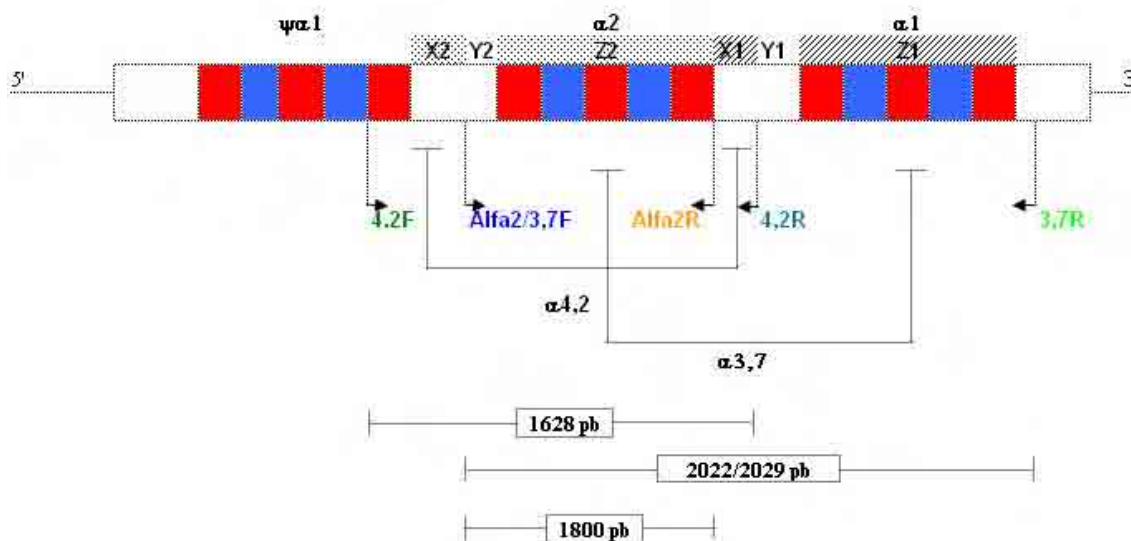


Figura 19: Representação esquemática da localização dos *primers* utilizados na caracterização molecular de alterações no gene da globina alfa humana.

2.11 Identificação dos genótipos Constant Spring

Os genótipos Constant Spring foram padronizados por PCR-AE, adaptado do protocolo de Fucharoen e Fucharoen (1994), sendo a reação realizada em dois tubos para um volume final de 100 μ L: 20 mmol/L de tampão; 0,2 mmol/L de cada dNTP; 1,25 U de Go Taq DNA polimerase (Promega); 50,0 a 100,0 ng de DNA genômico e 0,2 μ mol/L de cada *primer*; no tubo 1 foram adicionados os *primers* PCO1, PCO9, AlfaG1 e AlfaG4 e no tubo 2 PCO1, PCO9, AlfaG2 e AlfaG4. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por 4 minutos, acrescida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, seguida de uma extensão final a 72°C por 4 minutos.

A análise dos produtos foi verificada em gel de agarose a 1,5%, evidenciadas com brometo de etídio e visualizadas sob transluminador.

```

6425
TGCCCCGGGCGAGCGGGATGGGCGGGAGTGGAGTGGCGGGTGGAGGGTGGAGACGTCCTGGCCCCGCCCCGCGTGA
CCCCAGGGGAGGCCGAGCCCGCCGCCGCCGCCCGCGCAGGCCCCGCGGGACTCCCCTGCGGTCCAGGCCGCGCC
CCGGGCTCCGCGCCAGCCAATGAGCGCCGCCCGGCCGGCGTGCSCCCGCGCCCAAGCATAAACCCCTGGCGCGCTCG
CGGCCCGGCACTTCTGTGCCACAGACTCAGAGAGAACCACCATTGGTGTGTCTCCTGCCGACAAGACCAACGTCA
AGCCCGCTGGGGTAAGGTCCGGCGCGCACGCTGGCGAGTATGGTGGGAGGCCCTGGAGAGGTGAGGCTCCCTCCCT
GCTCCGACCCGGGCTCCTCGCCCGCCGGACCCACAGGCCACCCTCAACCGTCTGGCCCCGACCCAAACCCACCCC
TCACTCTGCTTCTCCCGCAGGATGTTCTGTCTTCCCAACCACCAAGACCTACTTCCCGCACTTCGACCTGAGCCACGG
CTTGCCCCAGGTTAAGGGCCACGGCAAGAAGGTGGCCGACGCCCTGACCAAGCCGTGGCGCAGTGGACGACATGCC
AACGCGCTGTCCGCCCTGAGCGACCTGCACGCGCACAAGCTTCGGGTGGACCCGGTCAACTTCAAGGTGAGCGGGGGC
CGGAGCGATCTGGGTCGAGGGGCGAGATGGCGCCTTCTCTCAGGGCAGAGGATCACGCGGGTTGCGGGAGGTGTAG
CGCAGGCGGGCGGCTGCGGGCCTGGGCCGCACTGACCCTTCTCTGCACAGCTCCTAAGCCACTGCCTGTGTGACCC
TGGCCGCCACCTCCCGCCGAGTTACCCCTGCGGTGCACGCTCCCTGGACAAGTTCCTGGCTTCTGTGAGCACCGT
GCTGACCTCCAAATACCGTTAGCTGGAGCCTCGGTAGCCGTTCTCTGCCGATGGGCCTCCAACGGGCCCTCTC
CCCTCCTTGCACCGGCCCTTCTGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCAGCCTGTGTGCCTGGGTTCTCTGTCT
CCGAAATGTCCAACAATGGAGGTGTTACTGTCTCAGACCAAGGACCTCTCTGCAGCTGCATGGGGCTGGGGAGGG
AGAAGTGCAGGGAGTATGGGAGGGGAAGCTGAGGTGGGCCTGCTCAAGAGAAGGTGCTGAACCATCCCCTGTCCTGAGA
GGTGCCAGGCCTGCAGGCAGTGGCTCAGAAGCTGGGGAGGAGAGAGCATCCAGGGTCTACTCAGGGAGTCCCAGCAT
CGCCACCCTCCTTTGAATCTCCCTGGTTGAACCCAGTTAACATACGCTCTCCATCAAAACAAAACGAAACAAAACAACTA
GCAAAATAGGCTGTCCCAGTGAAGTGCAGGTGCCAGAACATTTCTCTATTCCACCCCTTCTGCCAGAGGGTAGGTG
GCTGGAGTGAGGGTGTCTGG
7947

```

Figura 20: Sequência parcial do gene da globina alfa 2 humana. As seqüências em vermelho caracterizam os exons e as em azul os introns. Os nucleotídeos em turquesa representam o *primer* AlfaG1 e AlfaG2, em azul o AlfaG4 e em rosa o codon de parada.

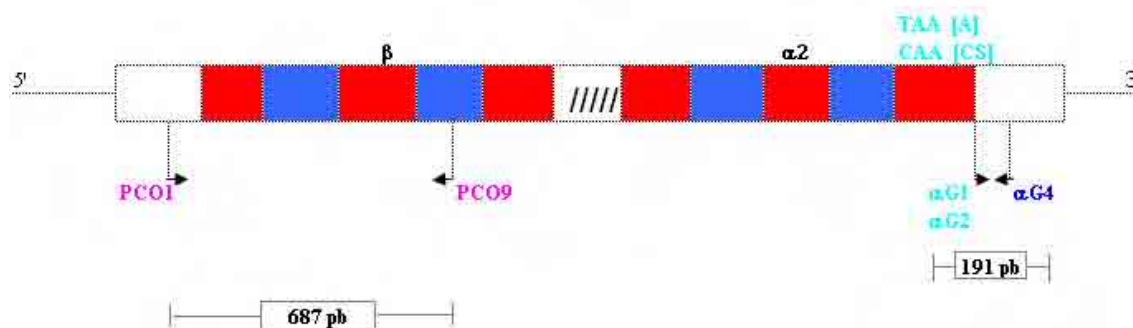


Figura 21: Representação esquemática da localização dos primers utilizados na caracterização molecular de Constant Spring.

2.12 Sequências nucleotídicas dos primers utilizados nas reações em cadeia da polimerase

As seqüências nucleotídicas dos primers utilizados nas reações em cadeia da polimerase alelo específicas e nas reações multiplex para a identificação de alterações nos genes das globinas beta, delta e alfa humana, estão apresentadas nas figuras 22 e 23.

PRIMERS	SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	COORDENADAS GENBANK LOCUS HUMHBB
Beta 5'-a Sense	5' GTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCA 3'	62008 – 62033
Beta 5'-b Antisense	5' AGGGGAAAGAAAACATCAA 3'	62649 – 62667
Beta A-b Antisense	5' TAACGGCAGACTTCTCCTC 3'	62205- 62223
Beta C-b Antisense	5' TAACGGCAGACTTCTCCTT 3'	62205- 62223
Beta S-b Antisense	5' TAACGGCAGACTTCTCCAC 3'	62205 – 62223
G7 Sense	5' GATACAATGTATCATGCCTCT 3'	63220 – 63240
H5 Antisense	5' GCAGCCTCACCTTCTTTCATGG 3'	63868 -63889
G30 Antisense	5' TGCACTGGTGGGGTGAATTC 3'	63530 – 63549
G40 Antisense	5' TGCACTGGTGGGGTGAATTG 3'	63530 – 63549
PCO1 Sense	5' GTCCAACCTCCTAAGCCAGTG 3'	61969 – 61988
PCO9 Antisense	5' CAGATACCCTGGGAACTACA 3'	62636 – 62655
TB110W Antisense	5' GGGTGGGAAAATAGACC 3'	62379- 62395
TB110M Antisense	5'GGGTGGGAAAATAGACT 3'	62379- 62395
PS39W Antisense	5' GACTCAAAGAACCTCTG 3'	62424- 62441
PS39M Antisense	5' GACTCAAAGAACCTCTA 3'	62424- 62441
IVSI6W Antisense	5' GTCTTGTAACCTTGATA 3'	62282-62298
IVSI6M Antisense	5' GTCTTGAACCTTGATG 3'	62282-62298
IVSI1W Antisense	5' GTAACCTTGATACCAAC 3'	62277-62293
IVSI1M Antisense	5' GTAACCTTGATACCAA 3'	62277-62293
E1 Sense	5' GACACACATGACAGAACAGCCAAT 3'	54568- 54591
E2 Sense	5'CGATCTTCAATATGCTTACCAAG 3'	61830- 61852
E3 Antisense	5'CATTCTGCTGTTTCCCATTCTA 3'	62724- 62745

Figura 22: *Primers* utilizados nas reações de PCR-AE e multiplex para determinação de mutações nos genes das globinas beta e delta humana.

PRIMERS	SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	COORDENADAS GENBANK LOCUS HSLIS10/HUMHBA4
LIS1F Sense	5' GTCGTCACTGGCAGCGTAGATC 3'	407 – 428
LIS1R Antisense	5' GATTCCAGGTTGTAGACGGACTG 3'	2887 – 2909
4,2F Sense	5' GGTTTACCCATGTGGTGCCTC 3'	3064 – 3084
ALFA2/3,7F Sense	5' CCCCTCGCCAAGTCCACCC 3'	5676 – 5694
ALFA2R Antisense	5' AGACCAGGAAGGGCCGGTG 3'	7457 – 7475
4,2R Antisense	5' CCCGTTGGATCTTCTCATTTC 3'	8920 – 8942
3,7R Antisense	5' AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG 3'	11494 – 11514
AlfaG1 Sense	5'-GCTGACCTCCAAATACCGTT-3'	7369-7388
AlfaG2 Sense	5'-GCTGACCTCCAAATACCGTC-3'	7369-7388
AlfaG4 Antisense	5' GTAAACACCTCCATTGTTGG 3'	7539-7558

Figura 23: *Primers* utilizados nas reações de PCR-AE e multiplex para determinação de mutações no gene da globina alfa humana.

RESULTADOS

Os resultados apresentados mostram as principais mutações observadas na população brasileira, sendo que algumas delas e que eram de nosso interesse caracterizar, não foi possível em decorrência da não obtenção de amostras representativas das mesmas. Por outro lado, os autores que relatam ou relataram o encontro de alguma hemoglobinopatia mais rara guardam apenas o hemolisado, sendo que esse, além de apresentar uma vida média pequena, também não fornece um conteúdo de leucócitos necessário para a obtenção do DNA para o referido estudo.

Na determinação dos genótipos AA, AS, SS, AC, CC e SC, observou-se como produto de amplificação, uma banda de 660 pb que caracterizava a validade e efetividade da reação, representando o controle positivo da mesma e devendo estar presente nos 3 tubos, enquanto uma banda de 216 pb aparece na dependência do *primer* utilizado, o que permitiu caracterizar os diferentes genótipos (Figuras 24 e 25).

Para a verificação do genótipo de Hb D utilizamos dois tubos de reações: quando o genótipo era normal observamos no tubo 1 bandas de 670 e 330 pb e no tubo 2 uma banda de 670 pb; quando heterozigoto, aparecia em ambos os tubos bandas de 670 e 330 pb e quando homozigoto mutante, no tubo 1 visualizava-se uma banda de 670 pb e no tubo 2 as bandas de 670 e 330 pb (Figura 26).

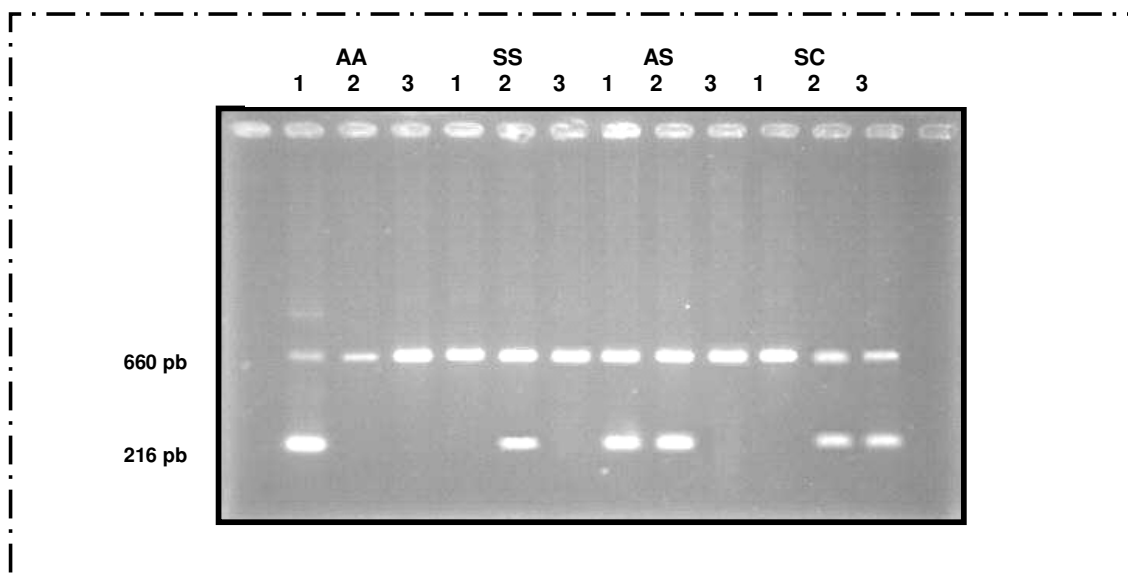


Figura 24: PCR alelo específica para identificação dos genótipos AA, SS, AS e SC. Produtos de amplificação observados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X pH 8,5, evidenciando bandas de 660 e 216 pb na dependência do genótipo analisado. Linhas 1, 2 e 3 *primers* normal, C e S.

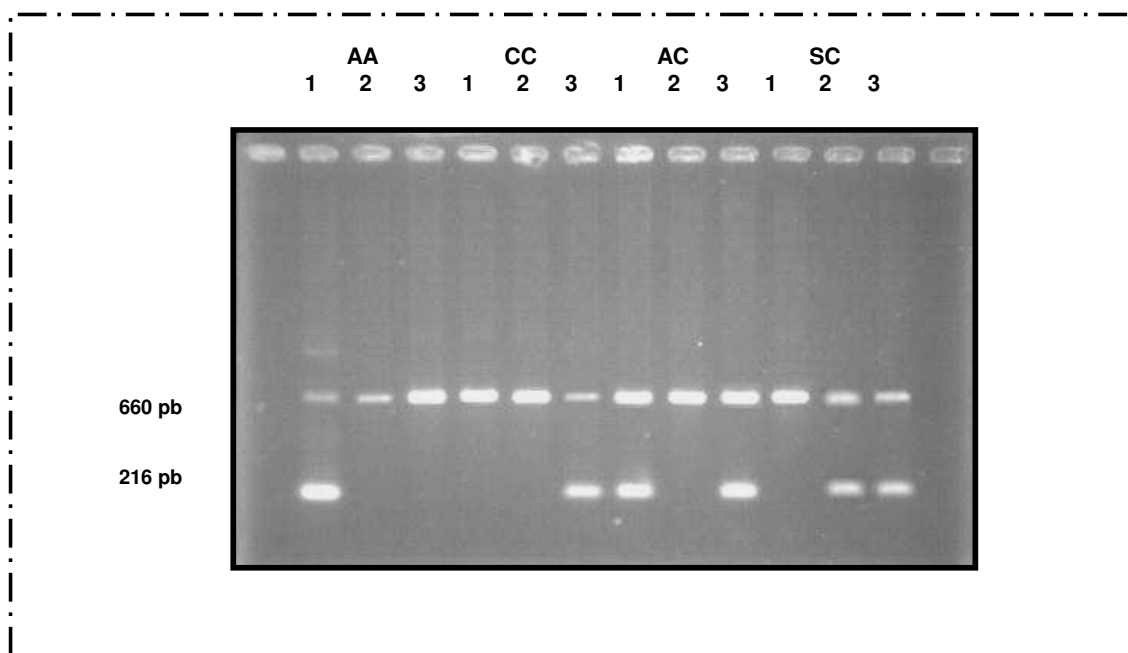


Figura 25: PCR alelo específica para identificação dos genótipos AA, CC, AC e SC. Produtos de amplificação observados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X pH 8,5, evidenciando bandas de 660 e 216 pb na dependência do genótipo analisado. Linhas 1, 2 e 3 *primers* normal, C e S.

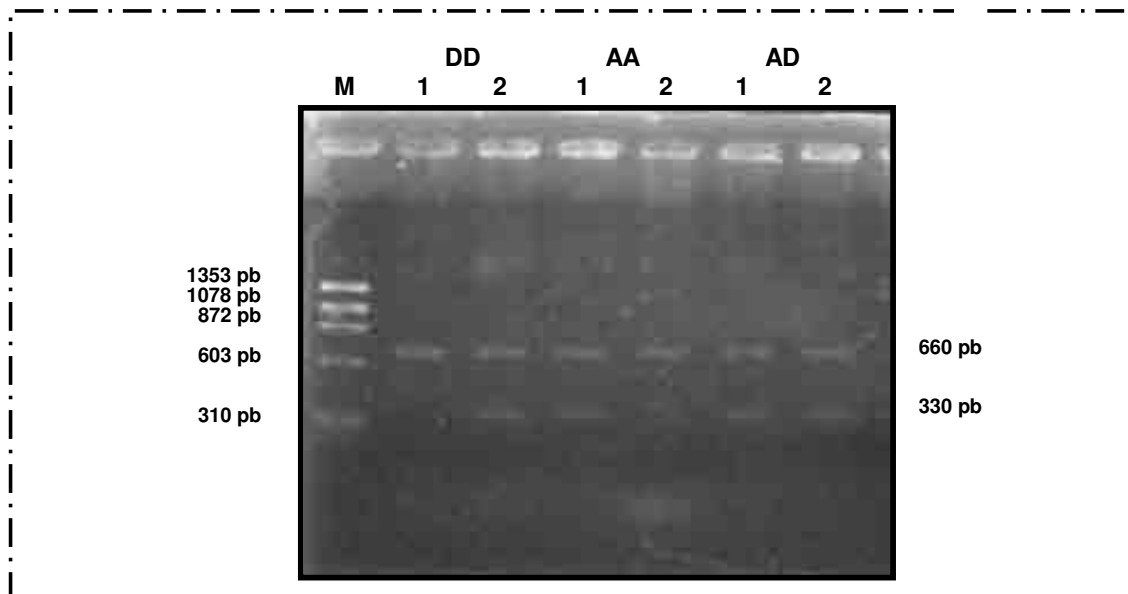


Figura 26: PCR alelo específica para identificação dos genótipos AA, AD e DD. Produtos de amplificação observados por eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TBE 1X pH 8,5, evidenciando bandas de 670 e 330 pb na dependência do genótipo analisado. M: ϕ X174/HaeIII.

Para determinar os genótipos SD, observou-se como produto de amplificação uma banda de 670 pb, como o controle positivo da reação, uma banda de 330 pb representando o genótipo D e outra de 216 pb para o genótipo S, caracterizando, assim, a interação SD. Se apenas a banda de 330 ou de 216 pb fosse visualizada, outra PCR deveria ser realizada de acordo com os protocolos padronizados, para caracterizar a homozigose ou heterozigose para a mutação em questão (Figura 27).

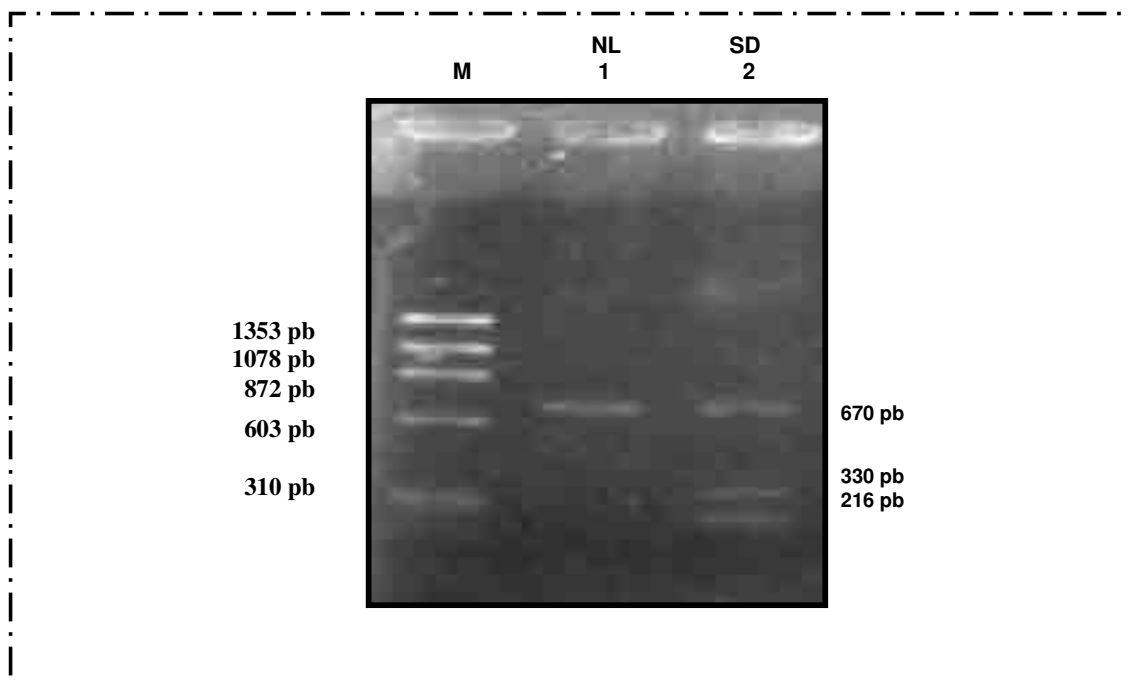


Figura 27: PCR multiplex para identificação do genótipo SD. Produtos de amplificação observados por eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TBE 1X pH 8,5, evidenciando bandas de 670, 330 e 216 pb. M: ϕ X174/HaeIII.

Para determinar os genótipos da talassemia do tipo beta, observou-se como produto de amplificação, uma banda de 687 pb, como o controle positivo da reação, enquanto uma banda de 436 pb representava o genótipo de IVS I-110, tanto normal como mutante, na dependência do tubo da reação. Para CD 39, uma banda de 482 pb representava o genótipo em questão, visualizando-se uma banda de 331 pb para o genótipo IVS I-6 e 326 pb para IVS I-1 também na dependência do tubo da reação (Figuras 28 a 31).

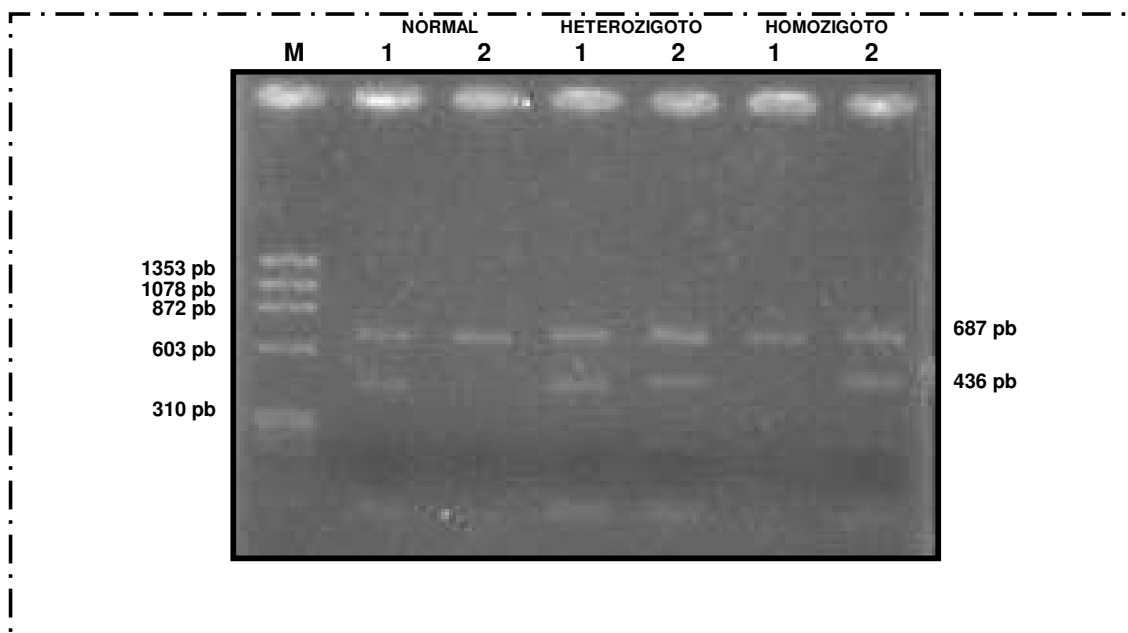


Figura 28: PCR alelo específica para identificação dos genótipos IVS I-110. Produtos de amplificação observados por eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TBE 1X pH 8,5, evidenciando bandas de 687 e 436 pb na dependência do genótipo analisado. M: ϕ X174/HaeIII.

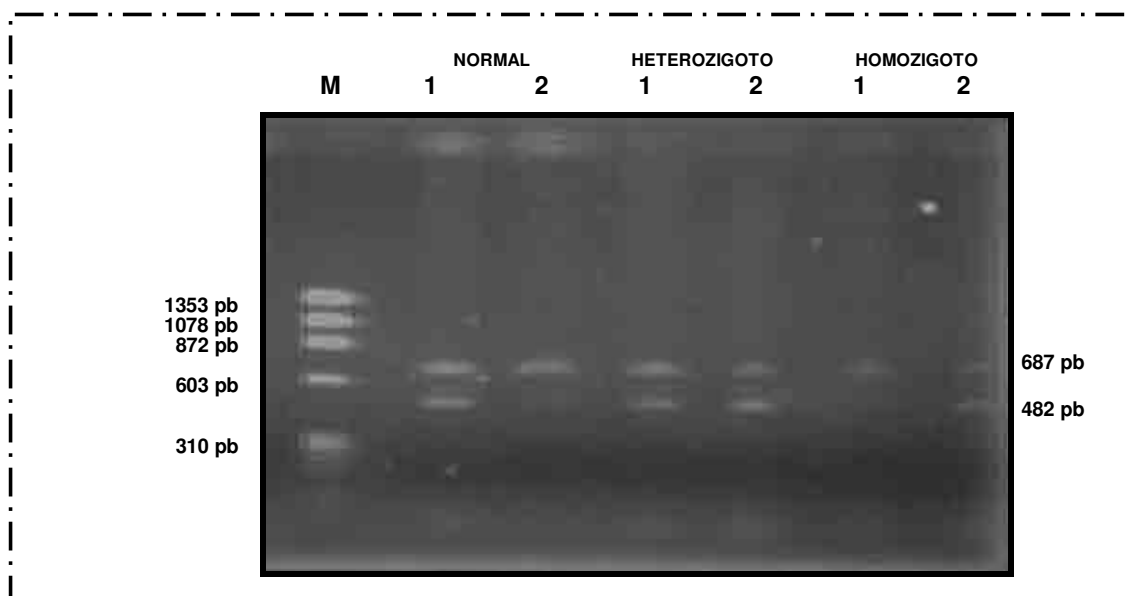


Figura 29: PCR alelo específica para identificação do genótipo CD 39. Produtos de amplificação observados por eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TBE 1X pH 8,5, evidenciando bandas de 687 e 482 pb, na dependência do genótipo analisado. M: ϕ X174/HaeIII.

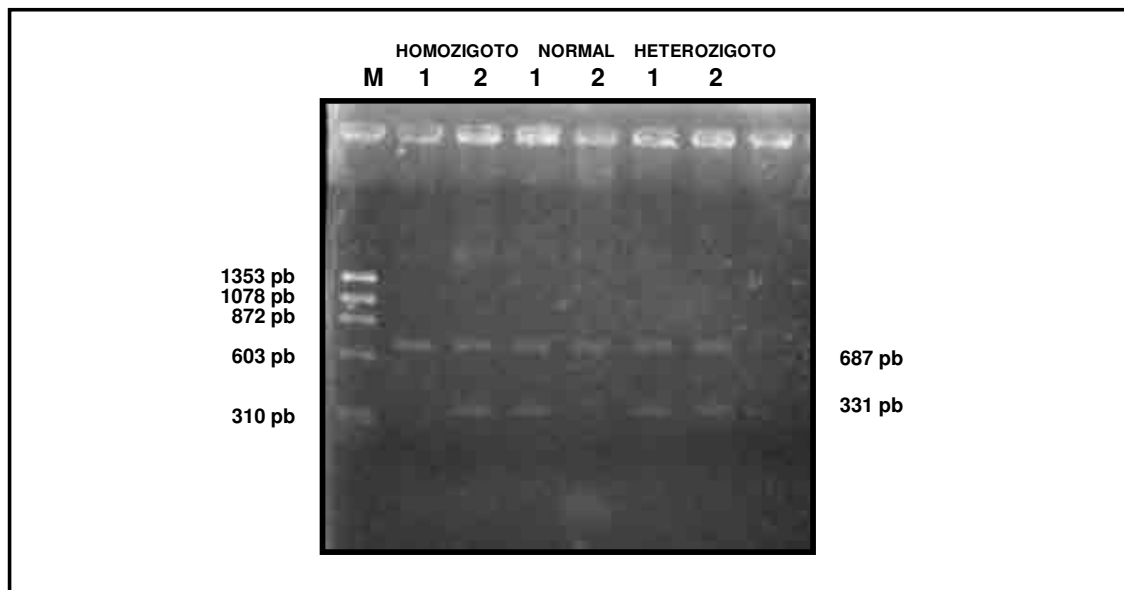


Figura 30: PCR alelo específica para identificação do genótipo IVS I-6. Produtos de amplificação observados por eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TBE 1X pH 8,5, evidenciando bandas de 687 e 331 pb, na dependência do genótipo analisado. M: ϕ X174/HaeIII.

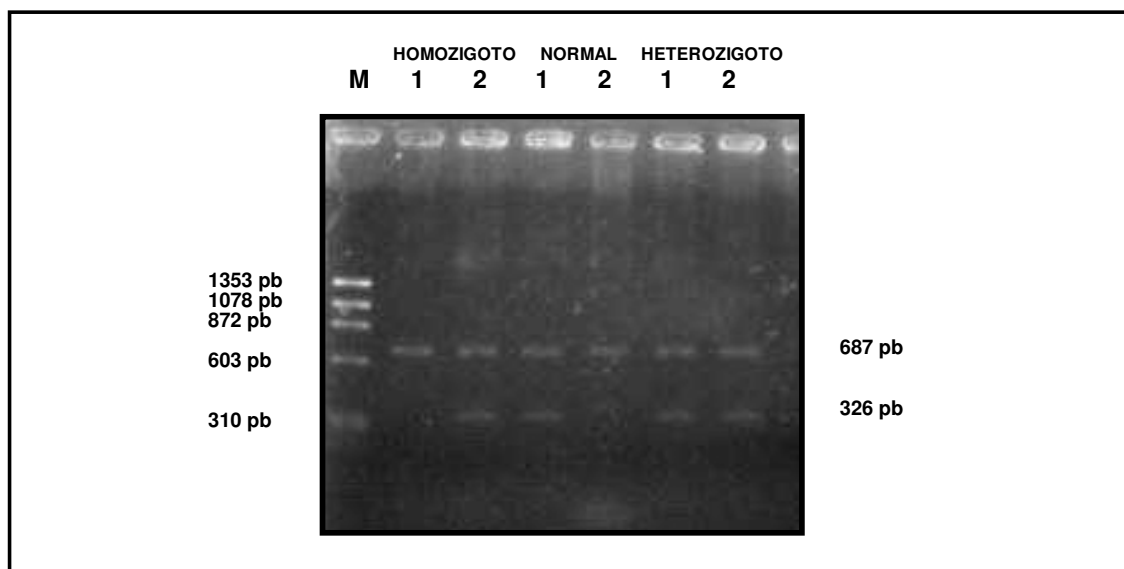


Figura 31: PCR alelo específica para identificação do genótipo IVS I-1. Produtos de amplificação observados por eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TBE 1X pH 8,5, evidenciando bandas de 687 e 326 pb, na dependência do genótipo analisado. M: ϕ X174/HaeIII.

Para determinar os genótipos C/ β^+ talassemia e S/ β^+ talassemia, observou-se como produto de amplificação, uma banda de 687 pb, como o controle positivo da reação, enquanto uma banda de 436 pb representava o genótipo de IVS I-110 e outra de 331 pb o genótipo IVS I-6, na dependência do tubo em que ocorria a reação; uma banda de 255 pb representava o genótipo C ou S, também na dependência do tubo da reação. Nesta PCR identificamos o duplo heterozigoto e se somente uma das mutações for evidenciada deve-se realizar os protocolos padronizados para caracterizar o homozigoto ou heterozigoto para a mutação em questão (Figura 32).

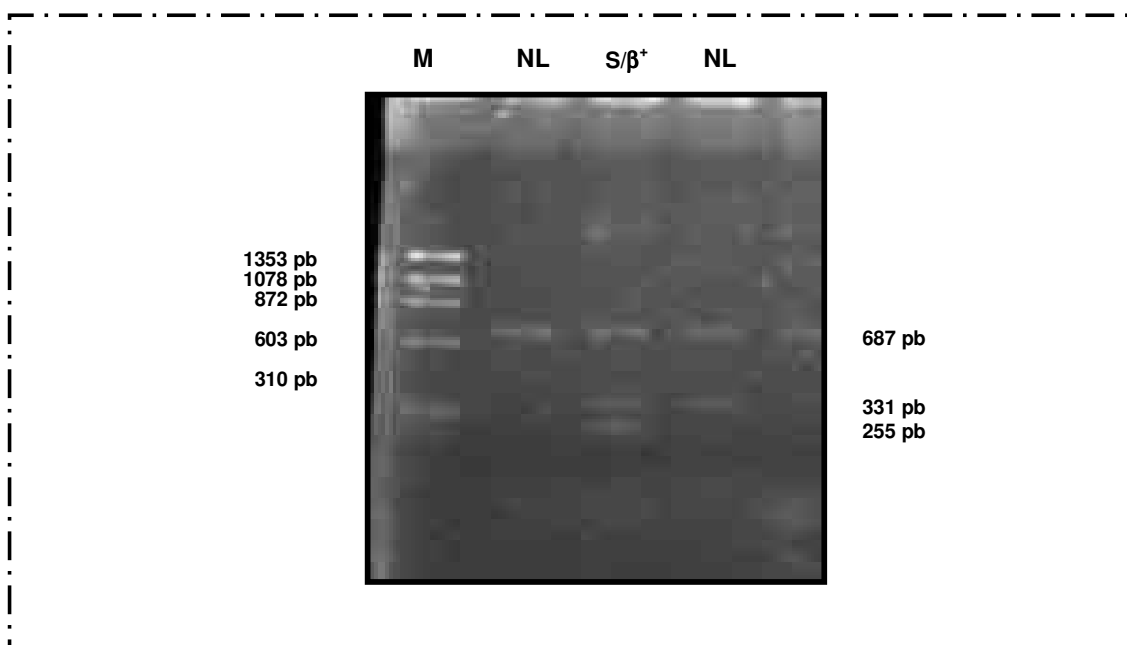


Figura 32: PCR alelo específica para identificação do genótipo C/ β^+ talassemia e S/ β^+ talassemia. Produtos de amplificação observados por eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TBE 1X pH 8,5, evidenciando bandas de 687, 436, 331 e 255 pb, na dependência do genótipo analisado. M: ϕ X174/HaeIII.

Na PCR multiplex para identificação de Hb Lepore foram utilizados três *primers* no mesmo tubo reacional de amplificação; para os alelos normais observamos uma banda de 915 pb, enquanto que para os heterozigotos foram verificadas duas bandas, uma de 915 pb e outra de 777 pb. Nesse sistema não era necessário um produto que representasse um controle interno da reação, pois se não fosse verificado uma banda de 915 pb significava que a reação não funcionou, já que a possibilidade de um homozigoto mutante é bastante rara (Figura 33).

A visualização das bandas na caracterização dessa mutação está relacionada a presença de uma deleção de 7,4 Kb, representada por um produto da fusão do exon 2 da globina δ (223 aminoácidos), onde são deletados 61, restando 162 aminoácidos, com o exon 2 da globina β (223 aminoácidos), sendo deletados 162, restando 61 aminoácidos.

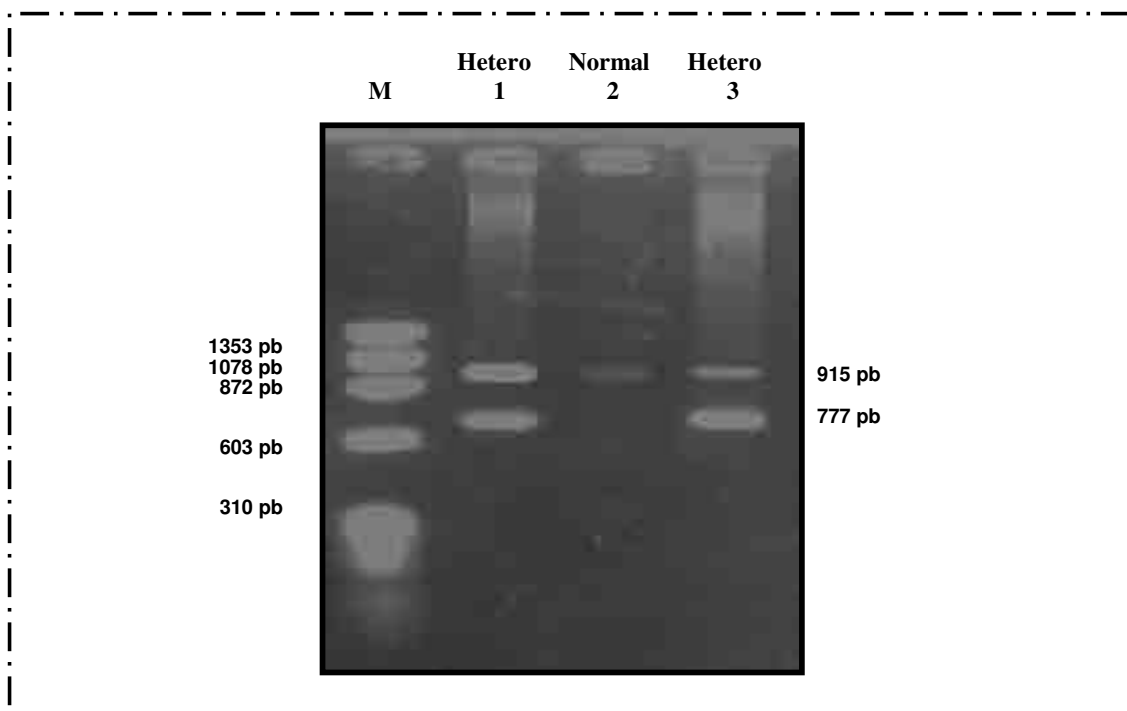


Figura 33: PCR multiplex para identificação do genótipo Lepore. Produtos de amplificação observados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X pH 8,5, evidenciando bandas de 915 e 777 pb dependendo do genótipo analisado. M: ϕ X174/HaeIII Digest.

Do mesmo modo, utilizamos uma PCR multiplex para diagnóstico dos dois tipos deletacionais comuns de talassemia alfa, a $\alpha^{3,7}$ e $\alpha^{4,2}$. Para caracterizar a mutação 3,7 heterozigota, que ocorre em cis para o alelo $\alpha^{3,7}$, um fragmento de 2022/2029 pb foi amplificado, juntamente com 1800 pb. A amplificação de somente um fragmento de 1800 pb do cromossomo 16 caracteriza um indivíduo normal. Para a deleção $\alpha^{4,2}$ um fragmento específico de 1628 pb foi visualizado. O par de *primers* LIS1F e LIS1R amplificava um fragmento de 2530 pb caracterizando a efetividade da reação (Figura 34).

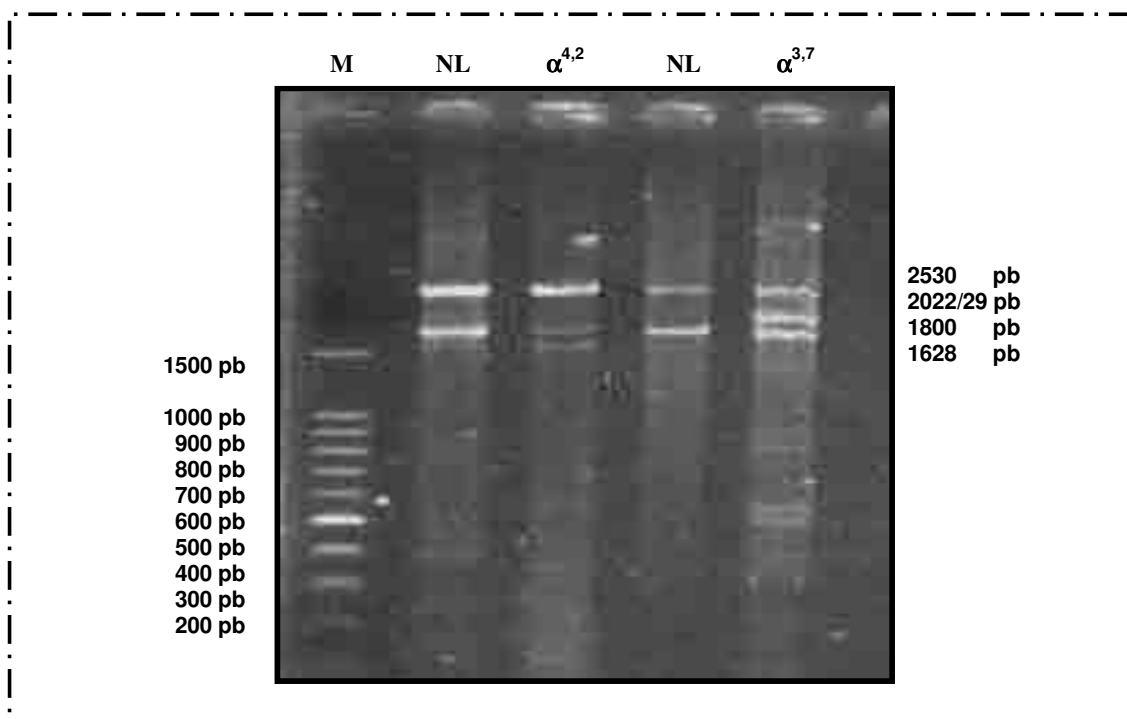


Figura 34: PCR multiplex para identificação do genótipo alfa. Produtos de amplificação observados por eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 1X pH 8,5, evidenciando bandas de 2530, 2022/2029, 1800 e 1628 pb na dependência do genótipo analisado. M: Ladder 100bp.

Na determinação do genótipo Constant Spring, observou-se como produto de amplificação, uma banda de 687 pb que caracterizava a validade e efetividade da reação, representando o controle positivo, enquanto uma banda de 191 pb, na dependência do *primer* utilizado, permitia caracterizar o genótipo normal ou heterozigoto (Figura 35).

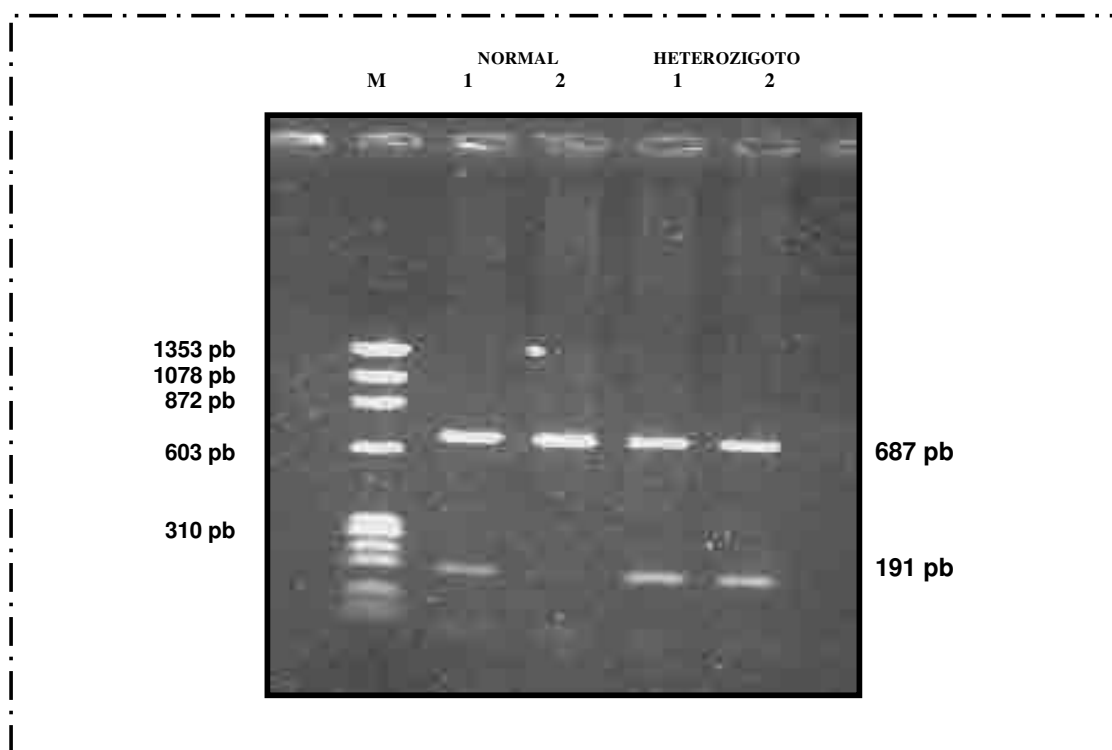


Figura 35: PCR-AE para identificação do genótipo Constant Spring. Produtos de amplificação observados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X pH 8,5, evidenciando bandas de 687 e 191 pb na dependência do genótipo analisado. M: ϕ X174/HaeIII.

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

DISCUSSÃO

Poucos autores brasileiros têm demonstrado a utilização de PCR-AE na rotina laboratorial, sendo que muitos realizavam a identificação de hemoglobinopatias, quando do auxílio diagnóstico por metodologia molecular, por ASO, enzimas de restrição e quando possível o seqüenciamento direto de parte do genoma onde a alteração podia estar ocorrendo.

Nosso trabalho teve como um dos objetivos padronizar a metodologia de PCR-AE para eliminar o uso de enzimas de restrição, que encarece o método, permitindo acesso a uma metodologia rápida, com custo relativamente baixo, sem a utilização de radioatividade e biotina ou congêneres e equipamentos caros e complexos. Dessa forma, pretendíamos realizar o diagnóstico laboratorial na identificação de hemoglobinopatias de interesse para a nossa população com apenas uma PCR específica ou associação dessas.

Em relação ao procedimento de extração do material genético, sua obtenção foi realizada pelo método salino, sendo que amostras de nosso laboratório e algumas obtidas em outros laboratórios tinham sido extraídas pelo método clássico do fenol-clorofórmio (Sambrook et al., 1989); em ambas as situações a quantificação do material genético e a reação de amplificação por PCR mostraram-se satisfatórias.

O método salino para a extração, baseado na precipitação proteica por NaCl a 6M, mostrou ser eficiente na recuperação do DNA, fornecendo concentrações acima de 100 µg/mL e apresentando uma relação entre as leituras em densidades óticas do DNA e de proteínas remanescentes no meio com valores entre 1,8 e 2,0, o que torna este material possível de ser utilizado. A desvantagem desse método está na impossibilidade de guardar o material genético por muito tempo, pois DNAs obtidos com esse procedimento e extraído a mais de seis meses evidenciaram, algumas vezes, outras frações de material desnaturado. O mesmo pode ser observado em material congelado e descongelado, o que evidenciou a necessidade de extrair o DNA o mais asséptico possível, acondicionar o mesmo solubilizado em Tris-EDTA 10/1 e conservado a 4°C.

O potencial de aplicação das técnicas de DNA recombinante em laboratórios tem crescido, em especial no diagnóstico molecular de doenças hereditárias. Em estudos genéticos populacionais são utilizadas técnicas de identificação de polimorfismo através das diferenças de tamanho dos fragmentos de

restrição (RFLP) que requerem métodos de extração de DNA rápidos e eficientes para processar um número de amostras significativo. Dessa forma, a obtenção do material genético em nosso trabalho foi realizada pelo método salino como escolha, pois verificamos que muitos dos métodos já desenvolvidos consomem tempo, envolvem a digestão com proteinase K, incubações com RNase, requerem um grande volume de sangue (10 a 15 mL) ou utilizam solventes orgânicos como fenol, clorofórmio e álcool isoamílico, que são altamente tóxicos (Salazar et al., 1997).

Embora estes métodos recuperem o DNA de alto peso molecular de uma grande variedade de amostras, eles requerem muitos passos incluindo a transferência dos extratos de DNA para recipientes adicionais ou a utilização de procedimentos de purificação do mesmo, aumentando o risco de troca de amostras e possível contaminação. Considerando estes aspectos, as técnicas mostram-se pouco apropriadas para uso na rotina dos laboratórios clínicos, onde a maioria dos testes de DNA para fins diagnósticos envolve a extração de DNA genômico dos leucócitos humanos, obtidos geralmente de sangue adicionado de EDTA ou ACD; entretanto, em alguns casos o volume de sangue disponível não é suficiente para todas as análises, por exemplo, na realização de *Southern blotting* (Salazar et al., 1997).

Assim, evitamos a utilização de solventes orgânicos e optamos pelo método salino para a extração, considerando este mais adequado para uso na rotina laboratorial, aplicável a estudos de genotipagem.

A padronização da PCR-AE mostrou-se um pouco trabalhosa, principalmente em relação ao ajuste da temperatura de anelamento das reações, pois esta, quando bem estabelecida, pode representar uma significativa melhora na resolução do procedimento, facilitando a diferença entre os resultados que caracterizam o alelo normal do mutante. Após essa padronização, a reação mostrou ser de fácil realização e aplicação no diagnóstico laboratorial.

Com esse objetivo, trabalhamos com *primers* que apresentavam diferentes temperaturas de anelamento, sintetizados de acordo com protocolos descritos na metodologia, além de utilizarmos outros *primers* de experiências positivas obtidas em trabalhos realizados em nosso laboratório, representados pelo par de *primers* PCO1 e PCO9, demonstrando grande reprodutibilidade em amplificar e fornecer como resultado uma banda de 687 pares de bases do gene da globina

beta humana, sendo, muitas vezes, utilizado como controle interno da reação e como *primer* não específico participante da reação alelo específica.

Realizamos também algumas tentativas para aumentar a capacidade de discriminação da reação alelo específica pela amplificação a baixas concentrações de dNTP, o que demonstrou efetividade no decréscimo de falsos positivos, mas diminuiu a concentração do produto esperado.

A padronização desta técnica está restrita, normalmente, ao uso de *primers* e aos demais reagentes utilizados numa PCR comum, utilizando-se em torno de 3 a 4 *primers* para identificar cada genótipo, sendo que alguns podem ser comuns a várias reações diferentes.

Uma grande vantagem desta metodologia em relação às demais é que, após a extração do DNA genômico, uma reação de PCR-AE demora em torno de 3 a 4 horas, podendo-se confirmar ou excluir a patologia e realizar outras PCRs para a correta identificação da mutação.

Esta metodologia também pode ser adaptada para a aplicação da técnica de multiplex utilizando três ou mais *primers* em um único tubo, com a possibilidade de identificar mais de um modelo de mutação em um local gênico, ou facilitar a identificação de portadores duplos heterozigotos.

O diagnóstico das talassemias e hemoglobinas variantes pode ser realizado, dentre diversas técnicas laboratoriais, por procedimentos eletroforéticos, como a eletroforese em acetato de celulose alcalina, a eletroforese em ágar citrato ou fosfato ácido, a focalização isoeétrica em gel constituído por acrilamida ou agarose em diferentes pHs e por cromatografia líquida de alta eficiência, dentre outros (Basset et al., 1982; Mario et al., 1997).

De acordo com US Department of Health and Human Services (1993) a identificação de alterações no gene S deve necessariamente incluir procedimentos que permitam o encontro de suas formas comuns, a saber: Hb AS, Hb SS, Hb SC e interações; o mesmo se aplica para a identificação do gene C.

Na identificação por metodologia molecular, vários autores relatam o uso de oligonucleotídeos alelo específicos (ASOs) e enzimas de restrição para a verificação de alterações na molécula de hemoglobina S, C e interações. No presente trabalho estas foram caracterizadas por reação em cadeia da polimerase alelo específica (PCR-AE), permitindo a detecção direta do alelo normal ou mutante no DNA genômico sem provas adicionais de hibridização, ligação ou clivagem com

enzima de restrição.

Através da PCR-AE foi possível distinguir os alelos mutantes S e C heterozigotos e homozigotos, além de diferenciá-los do alelo normal e do duplo heterozigoto SC. É importante salientar que principalmente no caso da interação representada pelo duplo heterozigoto C/beta talassemia, o diagnóstico laboratorial não se mostra resolutivo quando da aplicação de eletroforeses tradicionais.

Postnikov et al. (1993) realizaram a PCR-AE para a diferenciação entre os genótipos AS e SS, mostrando que esse procedimento é importante no diagnóstico rápido de homozigoto para Hb S e para pacientes com a interação Hb S/ beta talassemia, sendo necessário condições de anelamento estritas para que a reação ocorresse.

Um método rápido para diagnóstico diferencial de Hb S e outras variantes como Hb D e Hb Tak foi desenvolvido e validado, usando PCR-AE multiplex, para facilitar o programa de triagem de hemoglobinopatias na população asiática (Sanchaisuriya et al., 2004). Em nosso trabalho, padronizamos a identificação do duplo heterozigoto S/D também através de PCR multiplex. Os bons resultados obtidos permitiam verificar a validade dessa metodologia.

A mutação beta S pode ser detectada por PCR-AE ou análise de PCR-RFLP com endonuclease de restrição Mst II; também pode-se identificar a Hb D Punjab através de PCR-RFLP com a enzima de restrição EcoRI e também por PCR-AE (Sanchaisuriya et al., 2004), parecendo essa última mais prática na rotina laboratorial.

Outros estudos realizados mostram que o genótipo D pode ser detectado principalmente por seqüenciamento direto do produto da PCR, RFLP e análise de *Southern blotting* (Fioretti et al., 1993; Akar et al., 1995), podendo também ser identificado por PCR-AE multiplex, prática não muito comum em nosso país e que realizamos no presente trabalho.

Na nossa população, a ocorrência de Hb D Los Angeles foi relatada por Zago e Costa (1988) em quatro famílias brasileiras em estado de heterozigose, duplo heterozigoto Hb D/ β^+ talassemia e interação Hb S/ Hb D, sendo essas associações descritas também em vários países. Foi relatado por Naoum et al. (2002), a interação entre Hb D e talassemia beta em um indivíduo brasileiro e em seus familiares; a identificação da interação Hb S/ Hb D por amplificação gênica

multiplex, poderia facilitar o diagnóstico deste duplo heterozigoto, que não é efetivo por eletroforese em acetato de celulose como em agar ácido.

De acordo com Pirastu et al. (1988), o diagnóstico pré-natal para talassemias beta deve ser realizado com uso de poucas provas oligonucleotídicas e enzimas de restrição, mas capazes de detectar as mais freqüentes mutações que acometem este gene.

A aplicação do sistema de mutação de amplificação refratária (ARMS) para a detecção de talassemia beta foi realizada em indivíduos heterozigotos e fetos de casais de risco na população da Índia e Chipre, demonstrando ser resolutiva e própria para esse diagnóstico (Old et al., 1990).

Losekoot et al. (1990) afirmaram que a utilização de ASO pode identificar heterozigotos para talassemia beta, todavia mais de 20% das alterações não puderam ser identificadas por este método, sugerindo que a combinação de uma eletroforese em gel gradiente desnaturante (DGGE) e a determinação da seqüência direta de DNA genômico amplificado pela PCR representava uma alternativa válida em substituição a ASO. Do mesmo modo, podemos dizer que a PCR-AE representa uma possibilidade para esse diagnóstico.

Em um estudo realizado na população portuguesa, foram analisados os haplótipos do gene da globina beta e caracterizadas as mutações para as talassemias beta, por hibridização oligonucleotídica, em 14 pacientes com talassemia beta maior e 5 com interação HbS/beta talassemia originários do sudeste de Portugal. Destacam-se como prevalentes três mutações, a saber: CD 39, IVS I-1 e IVS I-110 com porcentagens de 53%, 32% e 10%, respectivamente (Coutinho Gomes et al., 1988). Por sua vez, a IVS I-6 também foi identificada na população da região nordeste de Portugal com relativa freqüência (Tamagnini et al., 1983).

Essas mutações são detectadas em populações mediterrâneas, sendo observadas de forma freqüente em indivíduos com origem antropológica desses povos ou de migrações e de miscigenação com nativos. Nosso país recebeu inicialmente a influência de povos portugueses e posteriormente de migrantes de origem mediterrânea, entre outros, o que faz com que o encontro dessas mutações em nossa população seja freqüente.

Em vista disso, um método de identificação destas mutações com característica de segurança, confiança diagnóstica e reprodutibilidade como a PCR-

AE poderia disponibilizar nos laboratórios de rotina uma possibilidade de diagnóstico laboratorial, o que pode ser visualizado pelos nossos resultados.

Considerando a possibilidade de identificar o gene S, o gene C e as diferentes talassemias beta que acometem a população brasileira pelo método da PCR-AE, a verificação de interações desses genes também foi viabilizada estabelecendo-se a metodologia necessária, em nosso trabalho. Os *primers* utilizados para a identificação dos genótipos S e C associados aos usados para verificação de talassemia beta, no caso IVS I-6 e IVS I-110, proporcionaram por PCR-AE a resolução da interação Hb S/ β^+ talassemia e Hb C/ β^+ talassemia, mostrando esta técnica ser importantíssima no diagnóstico dessas interações.

O diagnóstico de $\delta\beta$ talassemia é muito útil na identificação pré-natal, principalmente em populações em que pelo menos um dos pais for heterozigoto para PHHF, Hb Lepore e outras alterações no gene $\delta\beta$ (Craig et al., 1994).

Miranda et al. (1994) identificaram, por seqüenciamento, dois brasileiros de origem italiana e heterozigotos para Hb Lepore. Um grupo de portugueses e espanhóis heterozigotos também foi analisado por metodologia molecular, seqüenciamento e análise por enzima de restrição, sendo que estes indivíduos apresentaram fragmentos que definiam a região de *crossing over* entre $\delta 68\text{Leu}$ e $\beta 84\text{Thr}$, confirmados por digestão com Mael e BanI (Ribeiro et al., 1997).

Ropero et al. (1999) identificaram a Hb Lepore por HPLC, sendo que Craig et al. (1994) relataram o uso de PCR- AE para diagnóstico laboratorial dessa patologia.

Em nosso trabalho caracterizamos a Hb Lepore por metodologia de PCR multiplex, que se mostrou própria para esse auxílio diagnóstico laboratorial. Já com referência a PHHF, apesar de não termos obtido amostra representativa da mesma, é possível o seu diagnóstico por PCR-AE, sendo dependente apenas da estruturação de *primers* que hibridizem tangenciando a deleção responsável pela PHHF. Isso pode ser válido para os diferentes tipos de PHHF, quer seja a tipo 1, 2, 3 ou outras relacionadas.

A talassemia alfa tem sido referida como a mais comum hemoglobinopatia identificada no mundo, com uma freqüência que varia de 1% a 98%, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais devido às migrações ocorridas (Flint et al., 1986; Chong et al., 2000). É caracterizada pela redução ou ausência completa de

expressão do gene da globina alfa, envolvendo um ($-\alpha$) ou ambos ($--$) genes presentes no cromossomo 16, sendo esta diferença de expressão gênica responsável pela gravidade do quadro anêmico (Liu et al., 2000).

Para a identificação da talassemia alfa, existem métodos convencionais preconizados como a análise de cadeia globínica e/ou a análise gênica pela técnica de *Southern blotting*, procedimentos complexos, que necessitando de muito tempo para execução, apresentando ainda alto custo e utilizando, via de regra, isótopos radioativos, o que dificulta sua utilização nos laboratórios de rotina (Galanello et al., 1998; Shaji et al., 2000).

O advento das técnicas de análise do DNA permitiu a determinação precisa das mutações e sua freqüência nas diferentes partes do mundo (Weatherall, 1994). Através da técnica de reação em cadeia da polimerase ou variações da mesma, a detecção de talassemia alfa tornou-se mais viável (Oron-Karni et al., 1998); a reação é de fácil e rápida execução, apresentando custo acessível, não necessita da utilização de material radioativo, além da fácil interpretação dos resultados em relação ao método de *Southern blotting* (Chong et al., 2000).

A PCR é também uma técnica versátil, pois a partir de modificações nas condições da reação (*primers*, temperaturas, tampões), pode-se amplificar seqüências de DNA diversas e conseqüentemente, identificar os diferentes genes, portadores ou não da mutação. Estes atributos levaram ao desenvolvimento de uma ampla variedade de métodos baseados na PCR, tanto para pesquisa quanto para diagnóstico clínico de rotina (Walker; Rapley, 1999).

No Brasil, os estudos realizados relatam principalmente a utilização de técnicas de *Southern blotting* e de seqüenciamento (Zago et al., 1984; Sonati et al., 1991). Sendo assim, constatamos que existem poucos relatos de identificação de talassemia alfa por técnicas de biologia molecular, mais especificamente PCR-AE ou PCR-multiplex para triagem e identificação de portadores.

Bowden et al. (1992), Kattamis et al. (1996), Oron-Karni et al. (1998), Chong et al. (2000), constataram que a reprodutibilidade dos testes para diagnóstico de talassemia alfa pela técnica da PCR tem sido problemática, sendo que a alta homologia observada entre os dois genes alfa representa um fator limitante para a realização de uma PCR ideal. Outro fator interferente é a presença do *locus* com alta concentração de nucleotídeos C-G, tornando mais trabalhosa a escolha de *primers* com especificidade ideal ao teste e também dificultando a desnaturação, já que

regiões ricas em CG são mais estáveis. Por sua vez, de acordo com Tang et al. (2001), a utilização de temperaturas de anelamento relativamente altas parece contribuir na obtenção de resultados reprodutíveis nas reações.

A talassemia alfa caracteriza-se como a principal alteração relacionada a anemia microcítica em indivíduos que não respondem à terapia férrica oral, independente de sua origem étnica (Kazazian, 1990). Mesmo sabendo que esta patologia é prevalente, laboratorialmente torna-se menos identificada do que a talassemia beta, pois dependendo dos genes envolvidos, pode não apresentar alteração nas eletroforeses convencionais utilizadas na rotina, fato este responsável pelo não conhecimento real de sua frequência em nossa população (Adorno, 1998). De acordo com esse mesmo autor, o diagnóstico da talassemia alfa através da biologia molecular mostra-se necessário, já que a eletroforese pode fornecer falso diagnóstico de ausência de Hb Bart's em indivíduos heterozigotos para a deleção $\alpha^{3,7}$.

Para a escolha dos *primers* e protocolos utilizados na padronização da PCR multiplex para talassemia alfa, várias referências foram consultadas e observamos a preferência por um ou outro protocolo pelos autores de acordo com a prevalência da alteração na região estudada, devendo levar em consideração a mistura racial que ocorre nas mesmas.

Dentre as reações em cadeia da polimerase comumente descritas para a detecção de talassemia alfa, temos a desenvolvida por Dodé et al. (1992) como uma das mais utilizadas, detectando a deleção $\alpha^{3,7}$ e a triplificação 3,7 ($-\alpha\alpha^{3,7}$), mas com a necessidade de uma fase de pré-digestão do DNA com a enzima de restrição BamHI.

A reação em cadeia da polimerase multiplex citada por Bowden et al. (1992), detecta $--^{MED}/\alpha\alpha$, mas não as deleções $\alpha^{3,7}$ e $\alpha^{4,2}$, comuns na população brasileira.

A PCR descrita por Baysal e Huisman (1994) apresenta como vantagem o fato de detectar as deleções $\alpha^{3,7}$ tipo I e II e deleções $\alpha^{4,2}$, porém a reprodutibilidade não se mostrou adequada, com a presença de vários fatores interferentes como tampão, produtos inespecíficos na amplificação, tanto que, em 1996, Smetanina e Huisman, publicaram uma modificação desta técnica, utilizando novos pares de *primers*.

Na realização da PCR para talassemia alfa, Foglietta et al. (1996) destacam *primers* que apresentam diferentes concentrações para as deleções $\alpha^{3,7}$ e $\alpha^{4,2}$ e que as reações devem ser realizadas em diferentes temperaturas de anelamento para as deleções e diferentes números de ciclos.

Tang et al. (2001) desenvolveram um método de PCR simples e não radioativo capaz de detectar e diferenciar diversos tipos de talassemia alfa delecionais comuns, empregado em triagens de grandes populações e para aperfeiçoar o aconselhamento genético, utilizando *primers* marcados com fluorescência e purificados.

Para a escolha de um método seguro, eficaz e reprodutível, alguns critérios são considerados importantes como a facilidade da utilização em estudos populacionais, reagentes e equipamentos de fácil aquisição e custo relativo, praticidade e rapidez na realização das reações em cadeia da polimerase, obtenção de resultados de fácil interpretação e capacidade de detectar deleções comuns na região estudada.

De acordo com Jones e Poon (2002), a PCR multiplex tem demonstrado ser um método simples e rápido para identificar grandes deleções, ao invés de usar um mapeamento laborioso e caro do agrupamento do gene da globina alfa com diferentes enzimas e provas, principalmente quando se necessita realizar a triagem de várias mutações delecionais presentes em determinada região de estudo. Os resultados deste trabalho demonstraram que a PCR multiplex pode ser adicionada na estratégia diagnóstica para detecção de talassemias do tipo alfa, sendo uma ferramenta valiosa para triagem de pacientes com microcitose e avaliação pré-natal; deve-se levar em consideração que nenhum método simples é capaz de identificar todos os portadores de talassemia alfa, e que as provas diagnósticas podem incluir uma combinação de várias técnicas.

Normalmente, o diagnóstico laboratorial de portadores de α^0 talassemia pode ser realizado pela pesquisa de corpos de inclusão de Hb H, método que depende do observador e apresenta pouca sensibilidade, visto que o corante utilizado cora também os reticulócitos e que estes podem ser confundidos com os corpos de inclusão. O teste de precipitação de Hb H raramente é positivo na α^+ talassemia e o diagnóstico laboratorial, nestes casos, baseia-se na diminuição do VCM e ausência de outras causas de microcitose (Jones; Poon, 2002).

Na padronização de talassemia alfa, dificuldades foram encontradas, pois a reação em cadeia da polimerase ocorria sob altas temperaturas de anelamento, muitas vezes não amplificando os fragmentos desejados, e mesmo quando funcionava bandas inespecíficas eram visualizadas. Alguns autores como Kattamis et al. (1996), Oron-Karni et al. (1998), citam a necessidade da adição de DMSO e BSA nas reações, sendo que em nosso trabalho não utilizamos estes reagentes e conseguimos resultados satisfatórios com a realização de uma segunda amplificação, modificando a concentração dos *primers* e o uso de uma Taq DNA melhorada.

A Hb Constant Spring é caracterizada pela troca da primeira base no códon de parada da cadeia da globina alfa e pode ser detectada verificando-se a ausência de um sítio de restrição da MseI (T/TAA). Essa mutação ocasiona um acréscimo em aminoácidos até o próximo códon de parada, o que estrutura uma cadeia alfa com 31 aminoácidos a mais (Chang et al., 1997; Sanchaisuriya et al., 2002; Viprakasit et al., 2002).

Alguns relatos divulgam que em torno de 15% de pacientes previamente identificados como Hb CS, baseando-se na análise de hemoglobina, foram caracterizados como Hb Pakse, uma alteração da última base do mesmo códon de parada (Chan et al., 2003), levando os autores a reavaliarem a base molecular da talassemia alfa em outros pacientes com doença de Hb H não deletional (Chen et al., 1993).

Siratmanawong et al. (2001) descreveram a utilização de PCR multiplex para detecção de alterações alfa e beta talassêmicas, identificando também Hb CS em heterozigose, método este que facilita a caracterização e diagnóstico pré-natal das síndromes talassêmicas.

A severidade do quadro clínico em pacientes com a combinação Hb CS/ α^0 talassemia está correlacionada com o alto grau de deficiência de cadeia alfa observada em pacientes com este genótipo, comparando-se com a doença de Hb H deletional; a identificação desta interação foi realizada por *Southern blotting* utilizando-se várias enzimas de restrição como EcoRI, BglIII, RsaI, HindIII, XbaI, dentre outras (Harteveld et al., 2001).

Fucharoen e Fucharoen (1994) descrevem a PCR alelo específica para identificação de Hb CS e alfa talassemia 1 (tipo SEA), sendo que a reação utilizada para a identificação da Hb Constant Spring foi realizada com o uso de um *primer*

específico para o alelo normal e outro para o alelo mutante demonstrando maior resolatividade.

Deste modo, a reação em cadeia da polimerase alelo específica, detecta diretamente a mutação responsável pelas doenças genéticas, além de ser um método não radioativo, não requer clivagem enzimática e os resultados são visualizados após uma simples migração eletroforética, podendo complementar a rotina dos métodos laboratoriais para determinar o genótipo em questão. Uma grande vantagem dessa metodologia é facilitar a prevenção e a aplicação de programas de controle bem como o aconselhamento genético de talassemias e hemoglobinas variantes nas diversas regiões onde estas alterações são prevalentes, principalmente pela detecção de homozigotos, heterozigotos e interações.

Com relação a custos, ao realizarmos a técnica de PCR-AE, levando em consideração a utilização de 4 a 5 *primers* para cada tubo de reação, o dNTP e a Taq polimerase (Go Taq), já incluídos o tampão e cloreto de magnésio, verificamos uma redução de aproximadamente 25% no valor de uma reação de PCR-AE em relação a técnica de PCR com uso de enzima de restrição, considerando-se que para completar o auxílio diagnóstico laboratorial, utiliza-se duas ou mais enzimas de restrição. Na reação de PCR com o Kit Master Mix, adicionando-se os mesmos *primers* da reação anteriormente citada, verificamos um aumento de 100% em relação a PCR realizada com a Go Taq.

No cálculo não foi considerado o gasto com extração de DNA, mas considerou-se a agarose utilizada na confecção do gel e a necessidade do uso de marcador de tamanho, constatando ser a agarose o reagente de maior custo em uma reação de PCR.

Podemos inferir que o diagnóstico molecular de hemoglobinas variantes e talassemias deveria ser incluído na rotina laboratorial como exame complementar e necessário na identificação dessas desordens genéticas.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

1. Devido à importância das hemoglobinas variantes e talassemias na nossa população e a dificuldade na investigação de algumas delas, a partir das análises laboratoriais convencionais, foi possível padronizar um teste diagnóstico, baseado na amplificação gênica alelo específica (PCR-AE) e na amplificação gênica multiplex (PCR-Multiplex).

2. A aplicabilidade dessas metodologias proporcionou confiabilidade na interpretação dos resultados, sendo de fácil execução, podendo fornecer diagnóstico laboratorial em curto espaço de tempo.

3. Os *primers* utilizados mostraram-se próprios para o auxílio diagnóstico laboratorial proposto em nossos objetivos e mesmo com alguns deles apresentando diferentes temperaturas de anelamento, conseguimos realizar protocolos válidos para o diagnóstico.

4. As metodologias ou associações dos conhecimentos adquiridos possibilita a identificação de estados homozigotos, heterozigotos e interações as mais variadas, quer sejam de hemoglobinas variantes ou de talassemias do tipo beta ou alfa e observadas na população brasileira.

5. A estratégia no estabelecimento laboratorial dessas metodologias está na dependência das características antropológicas da população brasileira e/ou da região analisada.

6. O presente estudo possibilitou o estabelecimento de protocolos próprios para a identificação de hemoglobinopatias que acometem nossa população, podendo ser utilizados na rotina laboratorial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, S.Z. Isolation of DNA using salting-out procedure. **J. Biochem. Toxicol.**, v.9, p.191-198, 1994.

ADORNO, E.V.; ALBUQUERQUE, A.; REIS, M.G.; GONÇALVES, M.S. Caracterização molecular da talassemia $\alpha 2$ em uma população de Salvador-Bahia. **Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemot.**, v.20, p. 97, 1998.

AKAR ,N.; ÖSDEN, E; AKAR, E.; CIN, S.; ARCASOY, A. Discrimination of Hb D Los Angeles (B121 Glu-Gln) and Hb Beograd (B121 Glu-Val) by dual restriction enzyme analysis. **Am. J. Hematol.**, v.48, p.280-281, 1995.

ALFARANO, A.; GOTTARDI, E.; SERRA, A.; PIGA, A.; MANDRINO, M.; MAZZA, H.; CAMASCHELLA, C. Screening of beta-thalassemia mutations by PCR and ASO analysis in an italian population of mixed geographic origin. **Haematologica**, v.75, p. 506-509, 1990.

ALVARES FILHO, F.; NAOUM, P.C.; MOREIRA, H.W.; CRUZ, R.; MANZATO, A.J.; DOMINGOS, C.R. Age and racial geographic distribution of S hemoglobin in Brazil. **Sangre**, v.40, p.97-102, 1995.

ALLISON, A.C. Polymorphism and natural selection in the human populations. **Cold Spring Harbor Symp.**, v.29, p.137-149, 1964.

ASHLEY-KOCH, A.; YANG, Q.; OLNEY, R.S. Sickle hemoglobin (Hb S) allele and sickle cell disease: a huge review. **Am. J. Epidemiol.**, v.151, p.839-845, 2000.

BARG, R.; BARTON, P.; CAINE, A.; CLEMENTS, R.L.; FERGUSON-SMITH, M.A.; MALCOLM, S.; MORRISON, N.; MURPHY, C.S. Regional localization of the human α -globin gene to the short arm of chromosome 16 (16 p12 pter) using both somatic cell hybrids and *in situ* hybridization. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.32, p.252-253, 1982.

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 – 16 pter) by hybridization *in situ*. **J. Mol. Biol.**, v.156, p.269-278, 1982.

BASSET, P.; BRACONNIER, F.; ROSA, J. An update on electrophoretic and chromatographic methods in the diagnosis of hemoglobinopathies. **J. Chromatogr.**, v.227, p.267-304, 1982.

BAYSAL, E.; HUISMAN, T.H.J. Detection of common deletional α -thalassemia-2 determinants by PCR. **Am. J. Hematol.**, v.46, p.208-213, 1994.

BENZ, E.J. Estrutura, função e síntese das hemoglobinas humanas. In: BENNETT, J.C.; PLUM, F. (Eds.) **Cecil-tratado de medicina interna**. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. v.1, pt.13, p.960-965.

BERNINI, L.F.; HARTEVELD, C.L. Alpha-thalassaemia. **Bailliere. Clin. Haematol.**, v.11, p.53-90, 1998.

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

BIENVENU, T.; SEBILLON, P.; LABIE, D.; KAPLAN, J.C.; BELDJORD, A.C. Rapid and direct detection of the most frequent Mediterranean β -thalassemic mutations by multiplex allele-specific enzymatic amplification. **Human Biology**, v.64, n.1, p. 107-113, 1992.

BONINI-DOMINGOS, C.R. Thalassemia screening in Brazil – Results for 20 years. **Rev. Bras. Hematol. e Hemot.**, v.26, n.4, p.288-289, 2004.

BONINI-DOMINGOS, C.R.; PAIXÃO, B.M.C.; ZAMARO, P.J.A.; FERNANDES, A.R.C.; LEONELI, G.G.; SILVA JUNIOR, W.A. Identificação de HB Korle Bu por HPLC e biologia molecular. **Rev. Bras. Hematol. e Hemot.**, v.27, n.2, p.140-141, 2005.

BOWDEN, D.K.; VICKERS, M.A.; HIGGS, D.R. A PCR- based strategy to detect the common severe determinants of α -thalassemia. **Br. J. Haematol.** v.81, p.104-108, 1992.

BUNN, H.F.; FORGET, B.G. **Hemoglobin:** molecular, genetic and clinical aspects. Philadelphia: Saunders, 1986. 690p.

BUSCH, H.; RAMACHANDRA, R.; ROTHBLUM, L.; CHOI, Y.C. Sn RNA's, Sn RNP's and RNA processing. **Annu. Rev. Biochem.**, v.51, p.617-654, 1982.

CHANG, J.G.; LIU, H.J.; HUANG, J.M.; YANG, T.Y.; CHANG, C.P. Multiplex mutagenically separated PCR: diagnosis of β -thalassemia and hemoglobin variants. **BioTechniques**, v.22, p.520-527, 1997.

CHEHAB, F.F.; DOHERTY, M.; CAI, S.; KAN, Y.W.; COOPER, S.; RUBIN, E.M. Detection of sickle cell anaemia and thalassaemias. **Nature**, v.329, n.24, p.293-294, 1987.

CHEN, T.P.; LIN, S.F.; CHANG, J.G.; TSAO, C.J.; LIU, T.C.; CHIOU, S.S.; LIU, H.W. Molecular characterization of Hb H disease by polymerase chain reaction. **Acta Haematol.**, v.90, p.177-181, 1993.

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

CHONG, S.S.; BEHM, C.D.; HIGGS, D.R.; CUTTING, G.R. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of α -thalassemia. **Blood**, v.95, p.360-362, 2000.

CHUI, D.H.K.; FUCHAROEN, S.; CHAN, U. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. **Blood**, v.101, n.3, p.791-800, 2003.

CLARK, B.E.; THEIN, S.L. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. **Clin. Lab. Haem.**, v.26, p.159-176, 2004.

CLARKE, G.M.; HIGGINS, T.N. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: Review and update. **Clin. Chem.**, v.46, n.8, p. 1284-1290, 2000.

CLEGG, J.B.; WEATHERALL, D.J. Haemoglobin Constant Spring - A chain termination mutant? **Nature**, v.234, p.337-340, 1971.

COSTA, F.F. Biologia molecular – métodos básicos. **Boletim UNICAMP.**, v.13(156), p.8-9, 1991.

COSTA, F.F.; COSTA, S.C.B. Reação em cadeia da polimerase (PCR): princípios e aplicações clínicas. **Rev. Bras. Reumatol.**, v.32, n.3, p.142-146, 1992.

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

COSTA, F.F.; TAVELLA, M.H.; ZAGO, M.A. Deletion type alpha-thalassemia among brazilian patients with sickle cell anemia. **Rev. Bras. Genet.**, v.12, p.605-611, 1989.

COSTA, F.F.; FIGUEIREDO, M.S.; SONATI, M.F.; KIMURA, E.M.; MARTINS, C.S.B. The IVS-I-110 (G \rightarrow T) and codon 39 (C \rightarrow T) β -thalassemia mutations in association with α -thal-2 (-3,7 Kb) and Hb Hasharon [α 47(CE5)Asp \rightarrow His] in a brazilian patient. **Hemoglobin**, v.16, n.6, p.525-528, 1992.

COUTINHO GOMES, M.P.; GOMES DA COSTA, M.G.; BRAGA, L.B.; CORDEIRO-FERREIRA, N.T.; LOI, A.; PIRASTU, M.; CAO, A. β -thalassemia mutations in the Portuguese population. **Hum. Genet.**, v.78, p.13-15, 1988.

CRAIG, J.E.; BARNETSON, R.A.; PRIOR, J.; RAVEN, J.L.; THEIN, S.L. Rapid detection of deletions causing $\delta\beta$ thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification. **Blood**, v.83, p.1673-1682, 1994.

DODÉ, C.; KRISHNAMOORTHY, R.; LAMB, J.; ROCHETTE, J. Rapid analysis of $\alpha^{3,7}$ thalassemia and $\alpha\alpha\alpha^{3,7}$ triplication by enzymatic amplification analysis. **Br. J. Haematol.**, v.82, p. 105-111, 1992.

EMBURY, S.H.; MILLER, J.A.; DOZY, A.M.; KAN, Y.W.; CHAN, V.; TODD, D. Two different molecular organizations account for the single α -thalassemia-2 genotype. **J. Clin. Invest.**, v.66, p. 1319-1325, 1980.

FIGUEIREDO, M.S.; KERBAUY, J.; GONÇALVES, M.S.; ARRUDA, V.R.; SAAD, S.T.O.; SONATI, M.F.; STOMING, T.; COSTA, F.F. Effect of α -thalassemia and β -globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. **Am. J. Hematol.**, v.53, p.72-76, 1996.

FIORETTI, G.; DE ANGIOLETTI, M.; PAGANO, L.; LACERRA, G.; VIOLA, A.; DE BONIS, C.; SCARALLO, A.; CARESTIA, C. DNA polymorphisms associated with Hb D Los Angeles [β 121(GH4)GLU \rightarrow GLN] in southern Italy. **Hemoglobin**, v.17, n.1, p. 9-17, 1993.

FISCHEL-GHODISIAN, 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.; HILL, A.V.S.; BOWDEN, D.K.; OPPENHEIMER, S.J.; SILL, P.R.; SERJEANTSON, S.W.; BANA-KOIRI, J.; BHATIA, K.; ALPERS, M.P.; BOYCE, A.J.; WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. High frequencies of α -thalassaemia are the result of natural selection by malaria. **Nature**, v.321, p.744-750, 1986.

FOGLIETTA, E.; DEIDDA, G.; GRAZIANI, B.; MODIANO, G.; BIANCO, I. Detection of α -globin gene disorders by a simple PCR methodology. **J. Haematol.**, v.81, p.387-396, 1996.

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

FORGET, B.G. The pathophysiology and molecular genetics of beta thalassemia. **The Mount Sinai J. Medicine**, v.60, n.2, p.95-103, 1993.

FUCHAROEN, G.; FUCHAROEN, S. Rapid and simultaneous non-radioactive method for detecting α -thalassemia 1 (SEA type) and Hb Constant Spring genes. **Eur. J. Haematol.**, v.5, p.186-187, 1994.

FUCHAROEN, S.; AYUKARN, K.; SANCHAISURIYA, K.; FUCHAROEN, G. Atypical hemoglobin H disease in a Thai patient resulting from a combination of α -thalassemia 1 and hemoglobin Constant Spring with hemoglobin J Bangkok heterozygosity. **Eur. J. Haematol.**, v.66, p.312-316, 2001.

GALANELLO, R.; SOLLAINO, C.; PAGLIETTI, E.; BARELLA, S.; PERRA, C.; DONEDDU, I.; PIRRONI, M.G.; MACCIONI, L.; CAO, A. α -thalassemia carrier identification by DNA analysis in the screening for thalassemia. **Am. J. Hematol.**, v.59, p.273-278, 1998.

GONÇALVES, M.S.; SONATI, M.F.; KIMURA, M.; ARRUDA, V.R.; COSTA, F.F.; NECHTMAN, J.F.; STOMING, T.A. Association of Hb Santa Ana [$\alpha_2\beta_288(\text{F4})\text{Leu}\rightarrow\text{Pro}$] and Hb Porto Alegre [$\alpha_2\beta_29(\text{A6})\text{Ser}\rightarrow\text{Cys}$] in a Brazilian female. **Hemoglobin**, v.18, p.235-239, 1994a.

GONÇALVES, M.S.; NECHTMAN, J.F.; FIGUEIREDO, M.S.; KERBAUY, J.; ARRUDA, V.R.; SONATI, M.F.; SAAD, M.O.; COSTA, F.F.; STOMING, T.A. Sickle cell disease in a Brazilian population from São Paulo: a study of the beta S haplotypes. **Hum. Hered.**, v.44, p.322-327, 1994b.

GRIGNOLI, C.R.E.; WENNING, M.R.S.C.; SONATI, M.F.; KIMURA, E.M.; ARRUDA, V.R.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. Hb Rio Claro [$\beta 34(\text{B16})\text{Val}\rightarrow\text{Met}$]: a novel electrophoretically silent variant found in association with Hb Hasharon [$\alpha 47(\text{CE5})\text{Asp}\rightarrow\text{His}$] and α -thalassemia-2 ($-\alpha^{3.7}$). **Hemoglobin**, v.23, p.177-182, 1999.

HARTEVELD, C.L.; TRAEGER-SYNODINOS, J.; RAGUSA, A.; FICHERA, M.; KANAVAKIS, E.; KATTAMIS, C.; GIORDANO, P.C.; SCHIRILO, G.; BERNINI, L.F. Different geographic origins of Hb Constant Spring [α_2 codon 142 TAA \rightarrow CAA] **Haematologica**. v.86, p.36-38, 2001.

HARTEVELD, C.L.; LOSEKOOT, M.; HEISTER, J.G.A.M.; WIELEN, M.; GIORDANO, P.C.; BATELAAN, D.; DELFT, P.V.; HAAK, H.L.; WIJERMANS, P.W.; BERNINI, L.F. α -thalassemia in the Netherlands: a heterogeneous of both deletions and point mutations. **Hum. Genet.**, v.100, p.465-471, 1997.

HIGGS, D.R.; HILL, A.V.S.; BOWDEN, D.K.; WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.M. Independent recombination events between the duplicated human α -globin genes: implications for their concerted evolution. **Nucleic Ac. Res.**, v.12, p.6965-6977, 1984.

HIGGS, D.R.; CLEGG, J.M.; PRESSLEY, J.B.; HUNT, D.M.; WEATHERALL, D.J.; SERJEANT, G.R. Negro α -thalassemia is caused by deletion of a single α -globin gene. **Lancet**, v.2, p.272-276, 1979.

HOFFBRAND, A.V.; PETTIT, J.E. Genetic disorders of hemoglobin. In:____. **Color atlas of clinical hematology**. 3.ed. London: Mosby, 2000. p.85-106.

HONIG, G.R.; ADAMS III, J.G. **Human hemoglobin genetics**. Wien: Springer-Verlag, 1986. 452p.

HSU, S.L.; MARKS, J.; SHAW, J.P.; TAM, M.; HIGGS, D.R.; SHEN, C.C.; SHEN, C.K. Structure and expression of the human theta globin gene. **Nature**, v.331, p.94-96, 1988.

ITANO, H.A.; NEEL, J.V. A new inherited abnormality of human hemoglobin. **Proc. Nat. Acad. Sc.**, v.36, p.613-617, 1950.

JANE, S.M.; CUNNINGHAM, J.M. Understanding fetal globin gene expression: a step towards effective HbF reactivation in haemoglobinopathies. **Brit. J. Haematol.**, v.102, p.415-422, 1998.

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.

JONES, A.K.B.; POON, A. Evaluation of a single-tube multiplex polymerase chain reaction screen for detection of common alpha-thalassemia genotypes in a clinical laboratory. **Am. J. Clin. Pathol.** v.118, p.18-24, 2002.

KAPLAN, J.C.; DELPECH, M. **Biologie moléculaire et médecine**. 2.ed. Paris: Flammarion Médecine Sciences, 1990. 610p.

KATTAMIS, A.C.; CAMASCHELLA, C.; SIVERA, P.; SURREY, S.; FORTINA, P. Human α -thalassemias syndromes: detection of molecular defects. **Am. J. Hematol.**, v.53, p.81-91, 1996.

KAZAZIAN, H.H. The thalassemias syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. **Sem. Hematol.**, v.27, p.209-228, 1990.

KULOZIK, A.E.; LYONS, J.; KOHNE, E.; BARTRAM, C.R.; KLEIHAEUER, E. Rapid and non-radioactive prenatal diagnosis of β thalassaemia and sickle cell disease: application of the polymerase chain reaction (PCR). **Brit. J. Haematol.**, v.70, 455-458, 1988.

LACERRA G; FIORETTI G; DE ANGIOLETTI M; PAGANO L; GUARINO E; BONIS C; VIOLA A; MAGLIONE G; SCARALLO A; DEROSA L; CARESTIA C. Alpha (alpha)^{5.3} : a novel alpha⁺ deletion with the breakpoint in the alpha-2-globin gene and close proximity to an Alu family repeat between the psy-alpha-2 and psy-alpha-1 globin genes. **Blood**, v.78, n.10, p.2740-2746, 1991.

LAUER J; SHEN CKJ & MANIATIS T. The chromosomal arrangement of human α -like globin genes. Sequence homology and α -globin genes deletions. **Cell**, v.20, p. 119-130, 1980.

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-SCHULTZ, 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.

LEHMANN, H.; HUNTSMAN, R.G. **Man's haemoglobins**. Amsterdam: North Holland, 1974. 478p.

LINDEMAN, R.; HU, S.P.; VOLPATO, F.; TRENT, R.J. Polymerase chain reaction (PCR) mutagenesis enabling rapid non-radioactive detection of common β -thalassaemia mutations in Mediterraneans. **Brit. J. Haematol.**, v.78, p.100-104, 1991.

LIU, Y.T.; OLD, J.M.; MILES, K.; FISHER, C.A.; WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. Rapid detection of α -thalassaemia deletions and α -globin gene triplication by multiplex polymerase chain reactions. **Brit. J. Haematol.**, v.108, p.295-299, 2000.

LOSEKOOT, M.; FODDE, R.; HARTEVELD, C.L.; VAN HEEREN, H.; GIORDANO, P.C.; BERNINI, L.F. Denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing of PCR amplified genomic DNA: a rapid and reliable diagnostic approach to beta thalassaemia. **Br. J. Hematol.**, v.76, p.269-274, 1990.

LUKENS, J.N.; LEE, G.R. As hemoglobinas anormais: princípios gerais. In: LEE, G. R.; BITHELL, T. C.; FOERSTER, J.; ATHENS J. W.; LUKENS, J. N. **Wintrobe – hematologia clínica**. 1.ed. São Paulo: Manole, 1998. v.1, cap.36, p.1120-1152.

MAGGIO, A.; GIAMBONA, A.; CAI, S.P.; WALL, J.; KAN, Y.W.; CHEHAB, F.F. Rapid and simultaneous typing of hemoglobin S, hemoglobin C, and seven mediterranean β -thalassemia mutations by covalent reverse dot-blot analysis: application to prenatal diagnosis in Sicily. **Blood**, v.81(1), p.239-242, 1993.

MAKONKAWKEYOON, L.; SANGUANSEMSRI, T.; ASATO, T.; NAKASHIMA, Y.; TAKEI, H. Rapid detection of chain termination mutations in the $\alpha 2$ globin gene. **Blood.**, v.82(11), p. 3503-3504, 1993.

MARIO, N.; BAUDIN, B.; AUSSEL, C.; GIBOUDEAU, J. Capillary isoelectric focusing and high-performance cation-exchange chromatography compared for qualitative and quantitative analysis of hemoglobin variants. **Clin. Chem.**, v.43, p.2137-2142, 1997.

MARMITT, C.R.; HUTZ, M.H.; SALZANO, F.M. Clinical and hematological features of hemoglobin SC disease in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.19, p.731-734, 1986.

METZENBERG, A.B.; WURZER, G.; HUISMAN, T.H.J.; SMITHIES, O. Homology requirements for unequal crossing over in humans. **Genetics**, v.128, p.143-161, 1991.

MICHELSON, A.M.; ORKIN, S.H. Bondaries of gene conversion within the duplicated human α -globin genes. Concerted evolution by segmental recombination. **J. Biol. Chem.**, v.258, p.15245-15254, 1983.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.16(3), p.1215, 1988.

MIRANDA, S.R.P.; FIGUEIREDO, M.S.; KERBAUY, J.; GROTTA, H.Z.W.; SAAD, S.O.T.; COSTA, F.F. Hb Lepore_{Baltimore} ($\delta 50$ Ser $\beta 86$ Ala) identified by DNA analysis in a brazilian family. **Acta Haematol.**, v.91, p.7-9, 1994.

MIRANDA, S.R.P.; KIMURA, E.M.; TEIXEIRA, R.C.; BERTUZZO, C.S.; RAMALHO, A.S.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. Hb Camperdown [$\alpha_2\beta_2$ 104(G6)Arg→Ser] identified by DNA analysis in a Brazilian family. **Hemoglobin**, v.20, p.147-153, 1996.

MOREIRA, H.W. Diagnóstico molecular das talassemias do tipo beta por amplificação gênica (PCR) e eletroforese em gradientes desnaturantes (DGGE). **News Lab**, v.15, p.85-94, 1996.

NAOUM, P.C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997. 168p.

NAOUM, P.C.; MORAES, M.S.; RADISPIEL, J.; CAVALHERI, P.P.; VAERI, F.F. Hb D/ Talassemia beta associada à anemia crônica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.23(1), p.51-52, 2002.

NAOUM, P.C.; ÁLVARES FILHO, F.; DOMINGOS, C.R.B.; FERRARI, F.; MOREIRA, H.W.; SAMPAIO, Z.A.; MAZIERO, P.A.; CASTILHO, E.M. Hemoglobinas anormais no Brasil. Prevalência e distribuição geográfica. **Rev. Bras. Patol. Clin.**, v.23, p.68-79, 1987.

NEWTON, C.R.; GRAHAM, A.; HEPTINSTALL, L.E.; POWELL, S.J.; SUMMERS, C.; KALSHEKER, N.; SMITH, J.C.; MARKHAM, A.F. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). **Nucleic Ac. Res.**, p. 2503-2516, 1989.

NOGUEIRA, N.I.; GONZÁLEZ, F.A.; ROPER, P.; ANGUITA, E.; MILANI, A.C.; VILLEGAS, A. Homozygous Constant Spring: the first case described in the West. **Haematologica**, v.85(6), p. 667-669, 2000.

NOLLAU, P.; WAGENER, C. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. **Clin Chem**, v.43(7), p.1114-1128, 1997.

OKAYAMA, H.; CURIEL, D.T.; BRANTLY, M.L.; HOLMES, M.D.; CRYSTAL, R.G. Rapid, nonradioactive detection of mutations in the human genome by allele-specific amplification. **J. Lab. Clin. Med.**, v.114, p. 105-113, 1989.

OLD, J. Haemoglobinopathies. **Prenatal Diag.**, v.16, p.1181-1186, 1996.

OLD, J.M.; VARAWALLA, N.Y.; WEATHERALL, D.J. Rapid detection and prenatal diagnosis of β -thalassemia: studies in Indian and Cypriot populations in the UK. **Lancet**, v.336, p.834-837, 1990.

ORKIN, S.H.;GOFF, S.C.; HETCHTMAN, R.L. Mutation in an intervening sequence splice junction in man. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.78, p.5041-5045, 1981.

ORON-KARNI, V.; FILON, D.; OPPENHEIM, A.; RUND, D. Rapid detection of the common Mediterranean α -globin deletions/rearrangements using PCR. **Am. J. Haematol.**, v.58, p.306-310, 1998.

PAIVA E SILVA, R.B.; RAMALHO, A.S.; CASSORLA, R.M. A anemia falciforme como problema de saúde pública no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v.27, p.54-58, 1993.

PANTE-DE-SOUSA, G.; MOUSINHO-RIBEIRO, R.C.; SANTOS, E.J.; GUERREIRO, J.F. Beta-globin haplotypes analysis in afro-brazilians from the amazon region: evidence for a significant gene flow from Atlantic West Africa. **Ann. Hum. Biol.**, v.26, p.365-373, 1999.

PAULING, L.; ITANO, H.A.; SINGER, S.J.; WELLS, I.C. Sickle cell anemia, a molecular disease. **Science**, v.109, p.443, 1949.

PERI, K.G.; GAGNON, C.; BARD, H. Quantitative correlation between globin mRNAs and synthesis of fetal and adult hemoglobins during hemoglobin switchover in the perinatal period. **Pediatr. Res.**, v.43, p.504-508, 1998.

PIRASTU, M.; SAGLIO, G.; CAMASCHELLA, C.; LOI, A.; SERRA, A.; BERTERO, T.; GABUTTI, W.; CAO, A. Delineation of specific β -thalassemia mutations in high-risk areas of Italy: a prerequisite for prenatal diagnosis. **Blood**, v.71(4), p.983-988, 1988.

POSTNIKOV, Y.V.; MOLCHANOVA, T.P.; HUISMAN, T.H.J. Allele-specific amplification for the identification of several hemoglobin variants. **Hemoglobin**, v.17(5), p.439-452, 1993.

POYART, C.; WAJCMAN, H. Hemolytic due to hemoglobinopathies. **Mol. Aspects Med.**, v.17, p.129-142, 1996.

RIBEIRO, M.L.; CUNHA, E.; GONÇALVES, P.; MARTIN NUNEZ, G.; FERNANDEZ GALAN, M.A.; TAMAGNINI, G.P.; SMETANINA, N.S.; GU, L.H.; HUISMAN, T.H.J. Hb Lepore-Baltimore ($\delta^{68\text{Leu}}\text{-}\beta^{84\text{Thr}}$) and Hb Lepore-Washington-Boston ($\delta^{87\text{Gln}}\text{-}\beta^{\text{IVS-II-8}}$) in Central Portugal and Spanish Alta Extremadura. **Hum.Genet.** v.99, p.669-673, 1997.

ROBERTS, N.A.; SLOANE-STANLEY, J.A.; SHARPE, J.A.; STANWORTH, S.J.; WOOD, W.G. Globin gene switching in transgenic mice carrying HS2-globin gene constructs. **Blood**, v.89, p.713-723, 1997.

ROMAO L; OSÓRIO-ALMEIDA EA; HIGGS DR; LAVINHA J; LIEBHABER SA. Alpha thalassemia resulting from deletion of regulatory sequences far upstream of the alpha globin structural genes. **Blood**, v.78, p.1589-1595, 1991.

ROPERO, P.; GONZALES, F.A.; SÁNCHEZ, J.; ANGUITA, E.; ASENJO, S.; DEL ARCO, A.; MURGA, M.J.; RAMOS, R.; FERNÁNDEZ, C.; VILLEGAS, A. Identification of the Hb Lepore phenotype by HPLC. **Haematol.**, v.84, p.1081-1084, 1999.

ROSATELLI, C.; LEONI, G.B.; TUVERI, T.; SCALAS, M.T.; MOSCA, A.; GALANELLO, R.; GASPERINI, D.; CAO, A. Heterozygous β -thalassemia: relationship between the hematological phenotype and the type of β -thalassemia mutation. **Am. J. Hematol.**, v.39, p.1-4, 1992.

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.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; MACHADO, M.O.; CAVALLI, S.A.; GUZMÁN, E.C.R.; NGUYEN, N.Y.; HIRATA, R.D.C. Extração de DNA de coágulo sangüíneo humano como método alternativo para estudos de genotipagem, **Rev. Brás. Anal. Clin.**, v.29, n.3, p.151-54, 1997.

SALZANO, F.M.; TONDO, C.V. Hemoglobin types in Brazilian populations. **Hemoglobin**, v.6, p.85-97, 1982.

SAMBROOK, J.; FRISTCH, E.; MANIATIS, T. **Commonly used techniques in molecular cloning**. In molecular cloning: a laboratory manual. 2.ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

SANCHAISURIYA, K.; CHUNPANICH, S.; FUCHAROEN, G.; FUCHAROEN, S. Multiplex allele-specific PCR assay for differential diagnosis of Hb S, Hb D-Punjab and Hb Tak. **Clin. Chim. Acta**, v.343, p.129-134, 2004.

SANCHAISURIYA, K.; FUCHAROEN, G.; FUCHAROEN, S. Hb Paksé [(α 2) codon 142 (TAA \rightarrow TAT ou term \rightarrow Tyr)] in thai patients with EABart's disease and Hb H disease. **Hemoglobin**, v.26(3), p.227-235, 2002.

SCHNEE, J.; AULEHLA-SCHOLZ, C.; EIGEL, A.; HORST, J. Hb D Los Angeles (D Punjab) and Hb Presbyterian: analysis of the defect at the DNA level. **Hum. Genet.**, v.84, p.365-367, 1990.

SCHWARTZ, E. Abnormal globin synthesis in thalassemic red cells. **Semin. Hematol.**, v.11, p.549-567, 1974.

SHAJI, R.V.; CHANDY, S.M.; KRISSHNNAMOORTHY, R. A single tube multiplex PCR method to detect the common alpha thalassemia alleles. **Blood**, v.95, p.1879-1880, 2000.

SIGURET, V.; ANDREUX, J.P. Biological diagnosis of haemoglobinopathies by phenotype analysis. **Ann. Biol. Clin.**, v.55, p.103-112, 1997.

SIRIRATMANAWONG, N.; FUCHAROEN, G.; SANCHAISURIYA, K.; RATANASIRI, T.; FUCHAROEN, S. Simultaneous PCR detection of β -thalassemia and α -thalassemia 1 (SEA type) in prenatal diagnosis of complex thalassemia syndrome. **Clin. Biochem.** v.34, p.377-380, 2001.

SMETANINA, N.S.; HUISMAN, T.H.J. Detection of α -thalassemia-2 (-3,7 Kb) and its corresponding triplication $\alpha\alpha\alpha$ (anti-3,7 Kb) by PCR: an improved technical change. **Am. J. Hematol.**, v.53, n.3, p. 202-203, 1996.

SONATI, M.F.; COSTA, F.F. Hemoglobin Bart's in a brazilian black population. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.23, p.395-396, 1990.

SONATI, M.F.; FARAH, S.B.V.; RAMALHO, A.S.; COSTA, F.F. High prevalence of α -thalassemia in a black population of Brazil. **Hemoglobin**, v.15, p.309-311, 1991.

SONATI, M.F.; KIMURA, E.M.; GROTTTO, H.Z.W.; GERVÁSIO, S.A.; COSTA, F.F. Hereditary hemoglobinopathies in a population from southeast Brazil. **Hemoglobin**, v.20, p.175-179, 1996.

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

STUDENCKI, A.B.; CONNER, B.J.; IMPRAIM, C.C.; TEPLITZ, R.L.; WALLACE, B. Discrimination among the human β^A , β^S and β^C globin genes using allele-specific oligonucleotide hybridization probes. **Am. J. Hum.Genet.**, v.37, p.42-51, 1985.

SURREY S; CHAMBERS JS; MUNI D; SCHATZ E. Restriction endonuclease analysis of human globin genes in cellular DNA. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.83, p.1125, 1978.

SUTCHARITCHAN, P.; EMBURY, S.H. Advances in molecular diagnosis of inherited hemoglobin disorders. Erythrocytes, **Current Opinion in Hematology**, v.3, p.131-138, 1996.

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

TAN, A.S.C.; QUAH, T.C.; LOW, P.S.; CHONG, S.S. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for α -thalassemia. **Blood**, v.98, n.1, p.250-251, 2001.

TANG, D.C.; FUCHAROEN, S.; DING, I.; RODGERS, G.P. Rapid differentiation of five common α -thalassemia genotypes by polymerase chain reaction. **J. Lab. Clin. Med.** v.137, p.290-295, 2001.

UGOZZOLI, L.A.; LOWERY, J.D.; REYES, A.A.; LIN, C.I.P.; RE, A.; LOCATI, F.; GALANELLO, R.; MACIONI, L.; MAGGIO, A.; GIAMBONA, A.; LOUTRADI, A.; BOUSSIOU, M.; WALLACE, R.B. Evaluation of the betha gene 1 kit for the qualitative detection of the eight most common mediterranean β -thalassemia mutations. **Am. J. Hematol.**, v.59. p.214-222, 1998.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Guideline: laboratory screening for sickle cell disease. **Lab. Med.**, v.24, p.515-522, 1993.

VAGO, A.R.; PENA, S.D.J. Laboratory techniques for the detection of mutations in DNA. **Braz. J. Genetics**, v.20(2), p.339-344, 1997.

VARELA, V.; ABREU, S.; ROSSETTI, L.C.; TARGOVNIK, H. Mutaciones β -talasémicas más frecuentes en la población argentina. **Sangre**, v.41(2), p.137-140, 1996.

VIPRAKASIT, V.; TANPHAICHITR, V.S. Compound heterozygosity for α^0 -

thalassemia (--Thai) and Hb Constant Spring causes severe Hb H disease. **Hemoglobin**, v.26(2), p. 155-162, 2002.

WALKER, M.R.; RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. 1.ed., São Paulo: Atheneu, 1999. 136p.

WATERFALL, C.M.; COBB, B.D. Single tube genotyping of sickle cell anaemia using PCR-based SNP analysis. **Nucleic Ac. Res.**, v. 29(23), p.1-8, 2001.

WEATHERALL, D.J. The molecular basis for phenotypic variability of the common thalassaemias. **Mol. Med. Today**, v.1, p.15-20, 1995.

WEATHERALL, D.J. The thalassaemias. **Brit. Med. J.**, v.314, p.1675-1678, 1997.

WEATHERALL, D.J. The thalasseмии. In: STAMATOYANNOPOULOS, G.; NIENHUIS, A.W.; MAJERUS, P.W.; VARMUS, H. **The molecular basis of blood diseases**. 2.ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1994.

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.

WENNING, M.R.S.C. **Identificação de mutações estruturais e talassêmicas nos genes da globina alfa**. Tese de Mestrado, Universidade de Campinas (UNICAMP), 1999. 83 p.

WENNING, M.R.S.C.; KIMURA, E.M.; COSTA, F.F.; SAAD, S.T.O.; GERVÁSIO, S.; JORGE, S.B.; BORGES, E.; SILVA, N.M.; SONATI, M.F. α -globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.33, p.1041-1045, 2000a.

WENNING, M.R.S.C.; SILVA, N.M.; JORGE, S.B.; KIMURA, E.M.; COSTA, F.F.; TORSONI, M.A.; OGO, S.H.; SONATI, M.F. Hb Campinas [α 26(B7)Ala \rightarrow Val]: a novel, electrophoretically silent, variant. **Hemoglobin**, v.24, p.143-148, 2000b.

WU, D.Y.; UGOZZOLI, L.; PAL, B.K.; WALLACE, R.B. Allele-specific enzymatic amplification of β -globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86, p.2757-2760, 1989.

ZAGO, M.A.; COSTA, F.F. Hb D Los Angeles in Brazil: Simple heterozygotes and associations with β thalassemia and with Hb S. **Hemoglobin**, v.12(4), p. 399-403, 1988.

ZAGO, M.A.; COSTA, F.F. Hereditary hemoglobin disorders in Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.79, p.385-388, 1985.

ZAGO, M.A.; COSTA, F.F.; BOTTURA, C. Beta-thalassemia in Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.14, p.383-388, 1981.

ZAGO, M.A.; COSTA, F.F.; BOTTURA, C. Hemoglobin H disease in three Brazilian families. **Rev. Bras. Genet.**, v.7, p.137-147, 1984.

ZAGO, M.A.; COSTA, F.F.; BOTTURA, C. Thalassaemia intermedia in a family with β^0 -thalassaemia and Hb Hasharon. **J. Med. Genet.**, v.19, p.437-440, 1982.

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

ZAGO, M.A.; SILVA JR, W.A.; DALLE, B.; GUALANDRO, S.; HUTZ, M.H.; LAPOUMEROULIE, C.; TAVELLA, M.H.; ARAUJO, A.G.; KRIEGER, J.E.; ELION, J.; KRISHNAMOORTHY, R. Atypical β^S haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. **Am. J. Hematol.**, v.63, p.79-84, 2000.

ZAHA, A. **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Alegre, 1996.

ZENG, Y; HUANG, S. The studies of hemoglobinopathies and thalassemia in China – the experiences in Shanghai Institute of Medical Genetics. **Clin.Chim. Acta**, v.313, p.107-111, 2001.