



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Gisele Cristine de Souza Carrocini

Influência da $\delta\beta$ -Talassemia ou de elementos de regulação em indivíduos com Hemoglobina Fetal aumentada na população da região Noroeste do Estado de São Paulo

São José do Rio Preto - SP
2011

Gisele Cristine de Souza Carrocini

Influência da $\delta\beta$ -Talassemia ou de elementos de regulação em indivíduos com Hemoglobina Fetal aumentada na população da região Noroeste do Estado de São Paulo

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto - SP
2011

Carrocini, Gisele Cristine de Souza.

Influência da $\delta\beta$ -Talassemia ou de elementos de regulação em indivíduos com hemoglobina fetal aumentada na população da região Noroeste do Estado de São Paulo / Gisele Cristine de Souza Carrocini. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2011.

120 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Claudia Regina Bonini-Domingos
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Hematologia. 3. Hemoglobinopatia – Noroeste de São Paulo (Estado). 4. Talassemia. I. Bonini-Domingos, Claudia Regina. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 616.155

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

GISELE CRISTINE DE SOUZA CARROCINI

Influência da $\delta\beta$ -Talassemia ou de elementos de regulação em indivíduos com Hemoglobina Fetal aumentada na população da região Noroeste do Estado de São Paulo

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética, área de Genética Humana, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini Domingos
Professora Doutora
UNESP - São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Flavia Cristina Rodrigues Lisoni
Professora Doutora
UNESP - Ilha Solteira

Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior
Professor Doutor
USP – Ribeirão Preto

São José do Rio Preto, 25 de fevereiro de 2011

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP de São José do Rio Preto, com auxílio financeiro do Ministério da Saúde e do CNPq e CAPES.

Dedico este trabalho aos meus pais, Valdir e Marilza, e aos meus irmãos, Diego e Beatriz, meus grandes amores, por representarem a base de tudo aquilo que sou, por me apoiarem em todas as minhas decisões, por estarem ao meu lado em todos os momentos importantes da minha vida, por me ensinarem a persistir e alcançar os meus objetivos mesmo quando eles parecem estar tão distantes, por viverem os meus sonhos como se fossem os seus, e, principalmente, pelo amor incondicional dedicado a mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela sabedoria e discernimento para que eu pudesse trilhar meu caminho, por me atender em todos os meus pedidos e por me mostrar que os meus problemas são muito pequenos diante dos meus sonhos e das minhas vontades.

*Aos meus pais, **Valdir Carrocini e Marilza de Souza Carrocini**, pelo exemplo de pessoas vitoriosas e guerreiras, pela força, pelo apoio, pelo carinho, pela confiança, por serem meu alicerce e por me acompanharem no caminho que escolhi para mim.*

*Aos meus irmãos, **Diego de Souza Carrocini e Beatriz de Souza Carrocini**, pela admiração, amizade, apoio, carinho e companheirismo.*

A todos os meus familiares que, mesmo distantes geograficamente, acreditaram em mim e me tiveram como motivo de orgulho e exemplo.

*Ao meu grande e querido amigo, **Fernando Eidi Yoshimura**, e a família **Yoshimura**, pelo amor, pelo carinho, pela imensa amizade e por terem vivido comigo uma das fases mais importantes da minha vida.*

*Aos meus amigos da graduação, **Adriana (Lurdes), André (Jim), Marcelo (Preto), Marina, Naty, Paula, Taty e Raduan**, por terem feito parte de um dos momentos mais importantes da minha vida e por estarem nas minhas lembranças e no meu coração aonde quer que eu vá.*

*Aos meus amigos de república, **Gisane, Lidiane, Renata, Andréia, Haruo, Gabriel e Lucas**, pelo carinho, amizade, por me acolherem e por terem feito parte da minha segunda família.*

*Aos meus amigos de Ribeirão Preto, **Dé, Patrícia, Renata, Saulo, Tássia e Tiago**, pela imensa amizade, por me acolherem e me proporcionarem momentos de alegria e descontração.*

*Aos amigos do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), **Danilo, Belini, Paula, Larissa, Luciana, Tiago, Maria Isabel, Eliana, Isabeth, Vinicius, Ítalo, Júlia, Lidiane, Haruo, Willian, Isabela, Rafael, Marina, João Vitor** e àqueles que passaram pelo laboratório, pelos momentos de discussão, aprendizagem, amizade e diversão.*

Aos **Bonini-Domingos**, pela amizade, pelo carinho e por fazer de todos os alunos do laboratório parte dessa família maravilhosa.

Aos amigos **Belini, Danilo, Paula e Larissa** pelo auxílio nas análises laboratoriais e estatísticas e pela ajuda na correção de textos e artigos.

À minha querida orientadora, **Profa Dra Claudia Regina Bonini Domingos**, por ter acreditado no meu potencial, por ter despertado em mim a curiosidade e a vontade de trabalhar com hemoglobinas, por ter me mostrado que um bom pesquisador é aquele que atua dentro e fora do laboratório, por ter compartilhado um pouquinho do seu conhecimento comigo, pela imensa amizade e por tratar seus alunos como amigos/filhos, dedicando a todos muito carinho e amor.

Ao **CNPq** pela minha bolsa de estudos.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível e, de repente, você estará fazendo o impossível”

São Francisco de Assis

“Nada de grande se faz sem paixão”

Friedrich Hegel

RESUMO

A hemoglobina Fetal (Hb F), formada por duas cadeias globínicas alfa (α) e duas gama (γ) ($\alpha_2\gamma_2$), apresenta expressão reduzida em indivíduos adultos, variando de 0% a 1% do total de hemoglobinas. Os níveis aumentados de Hb F são decorrentes de mutações na família β -globina, que originam a Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF) e a Delta-Beta Talassemia ($\delta\beta$ -Talassemia). O controle na produção se dá por região reguladora e por regiões não pertencentes à família β -globina, dentre elas 2q16, 6q23, 8q e Xp22.2. Os objetivos do presente trabalho consistiram em verificar a presença e a frequência de duas mutações para a $\delta\beta$ -Talassemia, do polimorfismo *XmnI* e dos haplótipos β -globina em indivíduos saudáveis com Hb F aumentada do estado de São Paulo. Foram analisadas 60 amostras de sangue periférico de indivíduos adultos, saudáveis e sem queixa de anemia. Foram separadas em dois grupos de estudo, de acordo com os níveis de Hb F em grupo I - 34 amostras com Hb F variando de 2% a 15%; e grupo II - 26 amostras com níveis de Hb F superiores a 15%. Em relação aos polimorfismos analisados, foram encontrados três indivíduos heterozigotos (5%) para a mutação $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola, pertencentes ao grupo I, cujos níveis de Hb F estavam dentro da faixa de normalidade. A mutação $\delta\beta$ -Talassemia Siciliana não foi encontrada, fato que requer a investigação de outros polimorfismos relacionados ao aumento de Hb F na vida adulta. A frequência do polimorfismo *XmnI* foi de 33,3% e os níveis médios de Hb F foram de $15,48 \pm 11,69\%$. A frequência observada em nosso estudo para esse sítio polimórfico é maior do que os achados da literatura para indivíduos saudáveis. Esse polimorfismo foi mais presente em indivíduos com concentrações de Hb F abaixo de 15%. Para quatro das amostras positivas para esse polimorfismo os níveis de Hb F foram explicados pela presença das mutações para PHHF e $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola, de modo que a presença do sítio polimórfico *XmnI* não foi determinante para influenciar a expressão dos genes da γ -globina. Em relação aos haplótipos β -globina, foram encontrados 18 alelos e 27 padrões genotípicos distintos. O padrão genotípico mais frequente foi o Atp1/Atp2 (13,72%). Dos 18 alelos, foram observados 13 atípicos. Nossos achados apontaram o haplótipo V como o mais frequente (27,45%), seguido pelos haplótipos atípicos Atp2 (13,72%) e Atp1 (11,76%), e estes apresentaram maior relação com a presença de PHHF e com o polimorfismo *XmnI*. A frequência elevada do haplótipo V nas nossas amostras e a alta frequência de haplótipos atípicos podem refletir um intenso grau de miscigenação na população avaliada, sugerindo uma característica multiétnica para a população brasileira, com necessidade de avaliação de marcadores genéticos populacionais para corroborar tal hipótese.

Palavras-chave: Hb F. $\delta\beta$ -Talassemia. Polimorfismo *XmnI*. Haplótipos β -globina.

ABSTRACT

Fetal Hemoglobin (Hb F), formed by two alpha globin chains (α) and two gamma chains (γ) ($\alpha^2 \gamma^2$), has reduced expression in adults, ranging from 0% to 1% of total hemoglobin. Increased levels of Hb F are due to mutations in β -globin family, which cause the Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH) and Delta-Beta Thalassemia ($\delta\beta$ -Thalassemia). The control of the production takes place by the regulatory region and regions outside the β -globin family, among them 2q16, 6q23, 8q and Xp22.2. The aims of this study were to verify the presence and frequency of two mutations for $\delta\beta$ -thalassemia, of the *XmnI* polymorphism and β -globin haplotypes in healthy individuals with increased Hb F of the state of Sao Paulo. We analyzed 60 samples of peripheral blood of adults, healthy and without complaints of anemia. The samples were separated into two groups, according to the Hb F levels in group I - 34 samples with Hb F ranging from 2% to 15% and group II - 26 samples with Hb F levels above 15%. In relation to the polymorphisms examined, we found three heterozygous individuals (5%) for Spanish $\delta\beta$ -thalassemia, belonging to group I, whose Hb F levels were within the normal range. The Sicilian $\delta\beta$ -thalassemia mutation was not found, fact that requires the study of other polymorphisms related to the increase of Hb F in adult life. The frequency of *XmnI* polymorphism was 33.3% and the mean Hb F levels were $15.48 \pm 11.69\%$. The frequency observed in our study to this polymorphic site is higher than the findings in the literature for healthy subjects. This polymorphism was more prevalent in individuals with Hb F concentrations below 15%. For four samples positive for this polymorphism, the Hb F levels were explained by the presence of HPFH and Spanish $\delta\beta$ -Thalassemia mutations, so that the presence of *XmnI* polymorphic site was not determinative to influence the γ -globin genes expression. Regarding β -globin haplotypes, were found 18 alleles and 27 distinct genotypic patterns. The pattern Atp1/Atp2 was the most frequent genotype (13.72%). Of the 18 alleles were observed 13 atypical patterns. The results shows that the haplotype V was the most frequent (27.45%), followed by atypical Atp2 (13.72%) and Atp1 (11.76%), and showed higher correlation with the presence of HPFH and *XmnI* polymorphism. The high frequency of haplotype V in our samples and high frequency of atypical haplotypes may reflect a high rate of miscegenation in this population, suggesting an ethnic characteristic for the Brazilian population, requiring the evaluation of population genetic markers to corroborate this hypothesis.

Key-words: Hb F. $\delta\beta$ -Thalassemia. *XmnI* polymorphis. β -globin haplotypes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização cromossômica das famílias α e β -globina e composição das moléculas formadas em cada período do desenvolvimento.....	19
Figura 2. Sítios polimórficos utilizados para classificação dos haplótipos β^S segundo Sutton, Bouhassira, Nagel (1989), com destaque para o sítio <i>XmnI</i>	25
Figura 3. Blocos de desequilíbrio de ligação na região 6q23 e relação existente com diferentes populações.	28
Figura 4. Interação entre fatores de transcrição e BCL11A no silenciamento transcricional dos genes da γ -globina.....	29
Figura 5. Sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β -globina segundo Orkin et al. (1982).....	32
Figura 6. Fluxograma de testes de triagem básica e testes complementares para perfil de hemoglobinas, aos quais as amostras foram submetidas	38
Figura 7. Foto do gel de agarose 1,5% mostrando os fragmentos de DNA obtidos após a digestão enzimática para a região γ^G	46
Figura 8. Número de amostras heterozigotas para as mutações de PHHF e $\delta\beta$ -Talassemia avaliadas em relação aos grupos de estudo, com destaque para presença de ambas as mutações no grupo I e predominância da mutação PHHF no grupo II.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mutações de PHHF associadas com aumento de Hb Fetal, grupos populacionais e valores de Hb F.	23
Tabela 2. Mutações de $(\delta\beta)^0$ -Talassemia associadas com aumento de Hb Fetal, grupos étnicos e valores de Hb F.	24
Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de regiões da família β -globina.	43
Tabela 4. Misturas de reação de amplificação para identificação das mutações $\delta\beta$ -Talassemia Siciliana e $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola.	44
Tabela 5. Ciclagem das reações de PCR para as duas mutações de $\delta\beta$ -Talassemia analisadas.	44
Tabela 6. Tamanho dos fragmentos referentes às duas mutações avaliadas.	44
Tabela 7. Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas da família β -globina.	45
Tabela 8. Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas da família β -globina.	45
Tabela 9. Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição.	46
Tabela 10. Distribuição das mutações para PHHF e $\delta\beta$ -Talassemia nos dois grupos de estudo, separados com base na quantidade de Hb F.	48
Tabela 11. Frequência do polimorfismo <i>XmnI</i> e níveis de Hb F em diferentes populações saudáveis e com alterações de hemoglobinas, de origem étnica variada.	50
Tabela 12. Valores médios de Hb F em relação à presença e ausência do polimorfismo <i>XmnI</i>	50
Tabela 13. Distribuição dos genótipos para o polimorfismo <i>XmnI</i> nos dois grupos de estudo.	51
Tabela 14. Presença do polimorfismo <i>XmnI</i> em amostras heterozigotas para as mutações de PHHF e $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola.	51
Tabela 15. Caracterização dos alelos atípicos dos haplótipos β -globina.	52
Tabela 16. Frequência genotípica dos haplótipos β -globina nos grupos de estudo.	53
Tabela 17. Frequência dos alelos β -globina e distribuição nos grupos de estudo.	54

Tabela 18. Níveis de Hb F de acordo com os haplótipos β -globina.	55
Tabela 19. Relação entre os haplótipos β -globina e os outros polimorfismos investigados nas amostras analisadas.	56

LISTA DE ABREVIATURAS

Hb	hemoglobina
et al.	e outros
HS	sítio hipersensível à DNase
LCR	região controladora do <i>locus</i>
Hb F	hemoglobina fetal
Hb A	hemoglobina A (normal)
Hb S	hemoglobina S (falcêmica)
Hb S/beta	interação Hb S e beta talassemia
PHHF	Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal
$\delta\beta$ -Talassemia	Delta-beta Talassemia
GWAS	estudos de associação de genomas amplos
QTL	<i>locus</i> de característica quantitativa
CAR	República Centro Africana ou Bantu
SAUDI	Índia-Arábia Saudita
CAM	Camarões
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
PCR	Reação em cadeia da polimerase
EDTA	Ácido etinoadaminotetracético
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
TEB	Tris-EDTA-Borato
Kb	kilobase
pb	pares de base
UV	ultravioleta
SDS	dodecil sulfato de sódio
rpm	rotações por minuto
Atp	atípico
miRNA	microRNA

LISTA DE SÍMBOLOS

α	gene alfa
ζ	gene zeta
μ	gene mi
ρ	gene rho
θ	gene teta
ε	gene epsilon
γ^G	gene gama glicina
γ^A	gene gama alanina
δ	gene delta
β	gene beta
ψ	pseudogene
CD39	códon 39
β^+	beta mais talassemia
β^0	beta zero talassemia
β^S	gene beta S mutante
mM/L	mili molar por litro
ng/mL	nanograma por mililitro
g/dL	gramas por decilitro
μ L	microlitro
nm	nanômetro
mL	mililitro
U	unidade
NaCl	cloreto de sódio
MgCl ₂	cloreto de magnésio
KCl	cloreto de potássio
HCl	ácido clorídrico
Na ₂ HPO ₄	fosfato de sódio dibásico anidro
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	fosfato de Sódio monobásico Monohidratado
DP	desvio padrão
Mín-máx	valores mínimo e máximo

SUMÁRIO

1	Introdução	18
1.1	As Hemoglobinas Humanas	18
1.2	Organização estrutural dos genes globínicos	19
1.3	A Hemoglobina Fetal	20
1.4	A Hb F e sua relação com as beta-hemoglobinopatias	21
1.5	Regulação dos níveis de Hb F	21
1.6	Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF)	22
1.7	Delta-Beta Talassemia [$\delta\beta^0$ -Talassemia]	23
1.8	Polimorfismos genéticos envolvidos na regulação da Hb F	25
1.8.1	Polimorfismo <i>XmnI</i> (- 158 C \rightarrow T) – Cromossomo 11	25
1.8.2	Região 6q23 (<i>Locus HMIP</i>) – Cromossomo 6	27
1.8.3	Região 2p16 (<i>Locus BCL11A</i>) – Cromossomo 2	28
1.8.4	Região Xp22.2 – Cromossomo X	30
1.8.5	Região 8q – Cromossomo 8	30
1.9	Haplótipos da β -globina	31
2	Objetivos	34
2.1	Objetivos Gerais	34
2.2	Objetivos Específicos	34
3	Material	36
3.1	Casuística	36
3.2	Caracterização das amostras:	36
3.3	Considerações Éticas	37
3.4	Análise Estatística	37
3.5	Métodos	37
3.5.1	Análises Moleculares	38
4	Resultados	48
4.1	Análise da presença das mutações $\delta\beta$ -Talassemia Siciliana e $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola	48
4.2	Presença do polimorfismo <i>XmnI</i> (- 158 C \rightarrow T)	49
4.3	Identificação dos padrões de combinação dos haplótipos β -globina	52
5	Discussão	58
6	Conclusões	64
7	Referências	66
8	Apêndices	77
8.1	Apêndice A: Artigo de revisão a ser submetido à Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (ISSN: 1516-8484, Fator de Impacto: 0,3644, ano base 2009)	77
8.2	Apêndice B: Artigo científico submetido à revista Genetics and Molecular Research (ISSN:1676-5680. Fator de Impacto: 0,682)	95
8.3	Apêndice C: Resultados dos testes clássicos de triagem de hemoglobinas e análise molecular para as mutações de PHHF, $\delta\beta$ -Talassemia, polimorfismo <i>XmnI</i> e haplótipos β -globina	105
9	Anexo	109

Introdução

1 Introdução

1.1 As Hemoglobinas Humanas

A molécula de hemoglobina é uma proteína globular constituída por quatro subunidades: duas cadeias do tipo alfa (α) e duas do tipo beta (β). Cada uma dessas subunidades é composta de uma fração protéica, a globina, e de um grupo prostético, o heme, que contém uma molécula de ferro que se combina ao oxigênio, fazendo com que a hemoglobina seja capaz de transportá-lo (HONIG; ADAMS III, 1986).

Os genes da hemoglobina humana estão localizados em duas famílias gênicas, denominadas α (alfa) e β (beta) globina. A família de genes α está localizada no braço curto do cromossomo 16 e cada gene codifica uma cadeia polipeptídica que totaliza 141 aminoácidos. Essa família é composta por três genes inativos, os pseudogenes ($\psi\zeta$, $\psi\alpha$ e $\psi\rho$), três genes funcionais (ζ , α_1 e α_2) e dois genes com funções não identificadas *in vivo* (μ e θ_1) (WEATHERALL, CLEGG, 2001a). A família de genes β -globina está localizada no braço curto do cromossomo 11 e cada gene codifica uma cadeia polipeptídica que apresenta 146 aminoácidos. Essa família é composta por um pseudogene ($\psi\beta$) e cinco genes funcionais, expressos na mesma ordem em que estão dispostos no segmento de DNA (5' - ϵ γ^G γ^A δ β - 3') (GROSVELD et al., 1993; DILLON et al., 1997).

Durante a ontogenia das cadeias globínicas, os eritrócitos expressam diferentes genes pertencentes às famílias α e β -globina e a mudança na expressão dos mesmos ocorre em dois estágios distintos do desenvolvimento: (1) do período embrionário para o fetal, no início da gestação, e que envolve a mudança na expressão de ambas as globinas alfa [zeta (ζ) por alfa (α)] e beta [épsilon (ϵ) por gama (γ)]; e (2) do período fetal para o adulto, envolvendo a mudança apenas na beta globina [γ por beta (β)] (STAMATOYANNOPOULOS; GROSVELD, 2001). A Figura 1 ilustra a localização dos genes e a expressão tempo-específica.

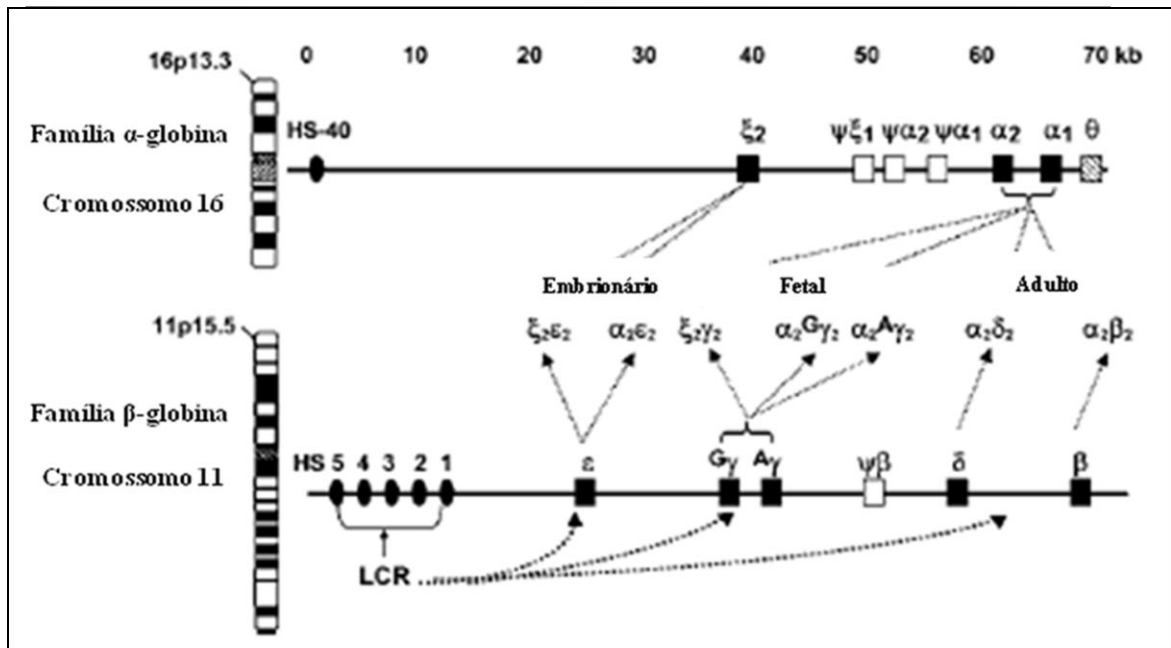


Figura 1. Localização cromossômica das famílias α e β-globina e composição das moléculas formadas em cada período do desenvolvimento (embrionário, fetal e adulto). Caixa vazia – pseudogene; caixa cheia – gene funcional (modificado de MANCA; MASALA, 2008).

1.2 Organização estrutural dos genes globínicos

Em geral, os genes globínicos são compactos e divididos em três exons e dois introns (HONIG; ADAMS III, 1986). O segundo intron dos genes γ apresenta tamanho diferente do primeiro devido à presença de uma sequência polimórfica, a repetição dinucleotídica (TG)_n(CG)_m, na região 3'. Alguns autores sugerem o possível envolvimento dessa sequência de microssatélite como potencial modulador da síntese de hemoglobina fetal (Hb F) (SLIGHTON et al., 1980; MANCA; MASALA, 2008). Os genes gama (γ), cuja expressão é predominante no período fetal, são resultantes de uma duplicação *em tandem* de 5 kilobases (kb) e diferem em apenas um aminoácido, glicina (γ^G) ou alanina (γ^A), na posição 136 da cadeia polipeptídica. Até o nascimento, as cadeias γ^G são mais abundantes, enquanto as cadeias γ^A predominam na vida adulta (SHEN et al., 1981; ZAGO et al., 2004).

A família de genes β-globina apresenta uma região denominada região controladora do locus (LCR), responsável pelo controle da expressão desses genes (Figura 1). É exclusiva da família de genes da β-globina e regula a síntese de cadeias de acordo com o estágio do desenvolvimento. Essa região é composta por cinco sítios hipersensíveis à digestão pela DNaseI, que estão localizados na posição 5' anterior ao gene ε. A região LCR tem como função alterar a estrutura da cromatina, de modo a torná-la acessível aos fatores de

transcrição, e interagir com os genes da globina (FORRESTER et al., 1986; BEHRINGER et al., 1987; ENVER et al., 1990; HANSCOMBE et al., 1991; JACKSON et al., 1996; LANGDON; KAUFMAN, 1998).

1.3 A Hemoglobina Fetal

A hemoglobina Fetal (Hb F) é formada por duas cadeias globínicas alfa (α) e duas gama (γ) ($\alpha_2 \gamma_2$). Essa hemoglobina é produzida em altos níveis durante o período fetal, devido à elevada expressão dos genes γ -globina e por apresentar alta afinidade pelo oxigênio. Em indivíduos adultos, o gene da β -globina é predominantemente expresso e a hemoglobina adulta, Hb A ($\alpha_2 \beta_2$), compreende 98% do total de hemoglobinas, enquanto os genes γ -globina são pouco expressos e a Hb F engloba até 1% do total. Variações nas concentrações de Hb F podem ser avaliadas pela identificação das células F, eritrócitos adultos que contêm quantidades mensuráveis dessa hemoglobina. Os níveis de células F e Hb F variam consideravelmente em indivíduos adultos saudáveis e, geralmente, existe correlação entre os níveis dessas células e de Hb F (MIYOSHI et al. 1988; PERUTZ, 2001; CHAKALOVA et al., 2005; STAMATOYANNOPOULOS, 2005; PACE; ZEIN 2006; MENZEL et al., 2007; XU et al, 2009).

Alguns fatores são conhecidos por influenciar os níveis de Hb F e células F em adultos saudáveis, incluindo idade, gênero e associação com variantes genéticas na família β -globina, além de outras regiões do genoma não-ligadas a esta. Estudos realizados por Garner et al. (2000a), avaliando os níveis de células F e Hb F em gêmeos monozigóticos e dizigóticos, forneceram uma boa evidência da existência de um forte componente genético no controle dos níveis de células F e Hb F em indivíduos adultos, visto que tais níveis foram maiores em gêmeos monozigóticos, indicando que 89% da variância nos níveis de células F pode ser atribuída a fatores genéticos. Além disso, foi verificado que os níveis de células F foram maiores em mulheres e diminuíram de acordo com a idade, corroborando a influência exercida pelo gênero e idade do indivíduo. Embora estudos de associação em famílias tenham revelado que os altos níveis de células F e Hb F tendem a ser herdados, o número de fatores genéticos envolvidos no modo de herança ainda não está claro (RUTLAND et al., 1983; MIYOSHI et al., 1988; GARNER et al, 2000a).

1.4 A Hb F e sua relação com as beta-hemoglobinopatias

O nível elevado de Hb F é conhecido por melhorar as manifestações clínicas das duas maiores alterações de hemoglobinas conhecidas: a anemia falciforme e a talassemia beta. Quando os genes da γ -globina são altamente expressos, a presença de níveis aumentados de Hb F nos eritrócitos pode compensar os produtos da beta globina alterada e reduzir significativamente os sintomas de ambas as doenças (WEATHERALL; CLEGG, 1981; STAMATOYANNOPOULOS et al., 1994; STEINBERG et al, 2001).

Em relação à anemia falciforme, a concentração de Hb F e sua distribuição entre os eritrócitos são os principais moduladores genéticos da doença, visto que altos níveis dessa hemoglobina diluem a quantidade de Hb S, inibindo ou retardando o processo de polimerização, o que resulta na redução da gravidade da doença (STEINBERG, 2009). Na talassemia beta homozigota, o aumento da produção de cadeias γ tem um efeito benéfico no quadro clínico, não apenas por reduzir o desequilíbrio das cadeias do tipo α /não α , mas também por produzir aumento na síntese da hemoglobina total e melhoria da eritropoese. Os níveis de Hb F são aumentados devido à sobrevivência seletiva dos precursores eritróides, que relativamente sintetizam mais cadeias do tipo gama. Assim, a maior expressão dos genes γ -globina tem relevância clínica no tratamento das doenças relacionadas à beta globina alterada (GALANELLO; CAO, 1998; THEIN, 2005; XU et al., 2009).

1.5 Regulação dos níveis de Hb F

A distribuição contínua de Hb F e células F nas populações sugerem que a variabilidade dessa característica não seja proveniente de herança de apenas um *locus* gênico, mas sim da combinação de múltiplos genes, localizados em cromossomos diferentes. Dessa forma, em termos genéticos, os altos níveis de Hb F na vida adulta são considerados como uma característica quantitativa, de modo que a atuação de múltiplos genes aliados a um componente ambiental poderia explicar a ausência de um claro padrão de herança mendeliana em relação à variabilidade de Hb F (MARTINEZ et al., 1989; THEIN; WEATHERALL et al., 1989; GARNER et al., 2000b).

Os níveis aumentados de Hb F são influenciados por mutações que ocorrem na família β -globina, dentre elas a Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF) e a Delta-Beta Talassemia ($\delta\beta$ -Talassemia) (WEATHERALL; CLEGG, 1981; HUISMAN et al., 1996).

Estudos de associação de genomas (GWAS) e estudos em famílias mostraram que regiões não pertencentes à família β -globina, dentre elas 2q16, 6q23, 8q e Xp22.2-22.3, estão implicadas na regulação de Hb F (NGUYEN et al., 2010). Aproximadamente 45% da variação nos níveis de Hb F está associada com a presença de três *locus* de característica quantitativa (QTLs) principais, que incluem o polimorfismo *XmnI* (-158 C \rightarrow T) (rs7482144) no cromossomo 11 (11p15), o *locus HMIP* no cromossomo 6 (6q23) e os SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) presentes no gene *BCL11A* no cromossomo 2 (2q16) (MENZEL et al., 2007; THEIN et al., 2009).

1.6 Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF)

A Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF) é uma condição benigna decorrente da não mudança perinatal da síntese de globina γ para β , resultando em produção substancial de cadeias γ e, conseqüentemente, de Hb F. As PHHF podem ocorrer por mutações pontuais na região promotora dos genes γ , sendo que essas mutações supostamente alteram a afinidade das proteínas reguladoras, necessárias para a repressão pós-natal da expressão dos genes γ , ou por deleções de parte da família β -globina, sem causar alterações nos genes codificadores das cadeias γ^G e γ^A (OLAVE et al., 2007; NUSSBAUM et al., 2008).

A variação nos níveis de Hb F é maior para as mutações pontuais (0,6% a 38,5%) do que para as mutações deletórias (16,0% a 30,0%). De maneira geral, indivíduos heterozigotos para as mutações de PHHF apresentam eritrócitos morfologicamente normais (HUISMAN et al., 1996). A Tabela 1 apresenta as diferentes concentrações de Hb F para as mutações pontuais e deletórias de PHHF, bem como os grupos populacionais que estão associados com cada uma das mutações.

Tabela 1. Mutações de PHHF associadas com aumento de Hb Fetal, grupos populacionais e valores de Hb F.

Tipo de mutação	Mutação (Grupo populacional)	% de Hb F*
Mutações Pontuais	- 110 (A → C) γ^G (Suiça)	0,6% - 0,8%
	- 114 (C → G) γ^G (Australiana)	8,6%
	- 114 (C → T) γ^G (Japonesa)	11,0% - 14,0%
	- 175 (T → C) γ^G	22,1%
	- 202 (C → G) γ^G	18,0% - 23,5%
	- 114 (C → T) γ^A (Geórgia)	4,7% - 4,8%
	- 117 (G → A) γ^A (Negra-Grega)	10,9% - 15,9%
	- 117 (G → A) γ^A (Grega-Italiana)	7,1% - 19,0%
	- 158 (C → T) γ^A (Grega)	2,9% - 5,1%
	- 175 (T → C) γ^A (Negra)	36,7% - 38,5%
	- 195 (C → G) γ^A (Brasileira)	4,5% - 7,0%
	- 196 (C → T) γ^A (Italiana)	12,0% - 16,0%
	- 198 (T → C) γ^A (Britânica)	1,8% - 13,0%
	- 202 (C → T) γ^A	1,6% - 3,9%
Deleções	PHHF-1 (Negra)	21,4% - 28,2%
	PHHF-2 (Gana)	21,6% - 27,2%
	PHHF-3 (Indiana)	21,6% - 23,6%
	PHHF-4 (Italiana)	21,0% - 30,0%
	PHHF-5 (Siciliana)	16,0% - 20,0%
	PHHF-6 (Tailandesa)	17,2% - 20,0%

Legenda: γ^G : gene gama glicina; γ^A : gene gama alanina; PHHF: Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal. *(HUISMAN et al., 1996).

1.7 Delta-Beta Talassemia [$(\delta\beta)^0$ -Talassemia]

As talassemias são caracterizadas pela redução ou ausência da síntese de cadeias polipeptídicas da hemoglobina e afetam, aproximadamente, 7% da população mundial. A ausência na síntese de algumas cadeias globínicas pode resultar no excesso das complementares, refletindo efeitos deletérios nos glóbulos vermelhos. São causadas por alterações genéticas que ocorrem com frequência nas regiões Mediterrâneas (Europeias) e no Sudeste Asiático. No Brasil, o fluxo migratório de populações caucasóides foi mais intenso nas regiões Sul e Sudeste do país, refletindo na maior frequência dessa alteração nessas regiões, de acordo com dados da Associação Brasileira de Talassemia - ABRASTA (<http://www.abrasta.org.br>) (SCHRIER, 1994; WEATHERALL; CLEGG, 2001b; BONINI-DOMINGOS, 2004; WEATHERALL, 2008).

A $(\delta\beta)^0$ -Talassemia é caracterizada pela expressão persistente dos genes γ -globina durante a vida adulta em associação com a expressão diminuída ou a ausência de expressão dos genes δ e β -globina, ocasionando um aumento nas concentrações de Hb F, além da presença de células com hipocromia e microcitose. As mutações para $(\delta\beta)^0$ -Talassemia ocorrem por grandes deleções envolvendo os genes δ e β -globina [$\gamma^G\gamma^A(\delta\beta)^0$ -Talassemia] e também o gene γ^A [$\gamma^G(\gamma^A\delta\beta)^0$ -Talassemia] (HUISMAN et al., 1975; COLLINS et al., 1984; CRAIG et al., 1997; FORGET, 1998; WEATHERALL; CLEGG, 2001b). Indivíduos heterozigotos para as mutações de $\gamma^G\gamma^A(\delta\beta)^0$ -Talassemia apresentam variação de Hb F entre 4,0% e 18,6%, enquanto que para as mutações $\gamma^G(\gamma^A\delta\beta)^0$ -Talassemia os níveis de Hb F encontrados variam de 9,3% a 25%. A Tabela 2 mostra a percentagem de Hb F relacionada à origem étnica desses dois tipos de $(\delta\beta)^0$ -Talassemias.

Tabela 2. Mutações de $(\delta\beta)^0$ -Talassemia associadas com aumento de Hb Fetal, grupos étnicos e valores de Hb F.

Tipo de mutação	Etnia	% de Hb F*
$\gamma^G(\gamma^A\delta\beta)^0$	Belga	14,0 % - 23,0%
	Malaiia-1	25%
	Negra	17,3% - 21,6% **
	Chinesa	9,3% - 15,7%
	Alemã	9,9% - 12,5%
	Turca	10,0% - 13,0%
$\gamma^G\gamma^A(\delta\beta)^0$	Macedônia	6,7% - 12,8%
	Tailandesa	9,9%
	Leste Europeu	13,0% - 18,0%
	Siciliana	4,0% - 18,6%
	Negra	24,8% **
	Espanhola	5,0% - 13,0%
	Japonesa	7,8%
	Turca	6,0% - 15,0%

Legenda: * (HUISMAN et al., 1996); ** Mutações associadas com a presença de Hb S.

Assim, heterozigotos para as mutações de PHHF e $(\delta\beta)^0$ -Talassemia, apresentam características clínico-laboratoriais distintas. Uma hipótese para tentar explicar essas diferenças fenotípicas entre essas duas condições, propõe que uma sequência reguladora necessária para o silenciamento dos genes γ -globina está deletada na PHHF, mas não na $(\delta\beta)^0$ -Talassemia, o que pode refletir nas diferentes concentrações de Hb F presentes em cada uma delas (HUISMAN et al., 1996; CHAKALOVA et al., 2005).

1.8 Polimorfismos genéticos envolvidos na regulação da Hb F

1.8.1 Polimorfismo *XmnI* (- 158 C → T) – Cromossomo 11

O polimorfismo *XmnI* (rs7482144), decorrente de uma sequência variante na posição 158 da região promotora do gene γ^G (C → T) que altera o reconhecimento do sítio da enzima *XmnI*, é comumente conhecido por influenciar a expressão dos genes γ^G e predispõe a uma expressão aumentada de Hb F. O sítio polimórfico *XmnI* constitui um dos cinco sítios utilizados na classificação dos haplótipos β^S , de acordo com Sutton, Bouhassira, Nagel (1989), como mostrado na Figura 2.

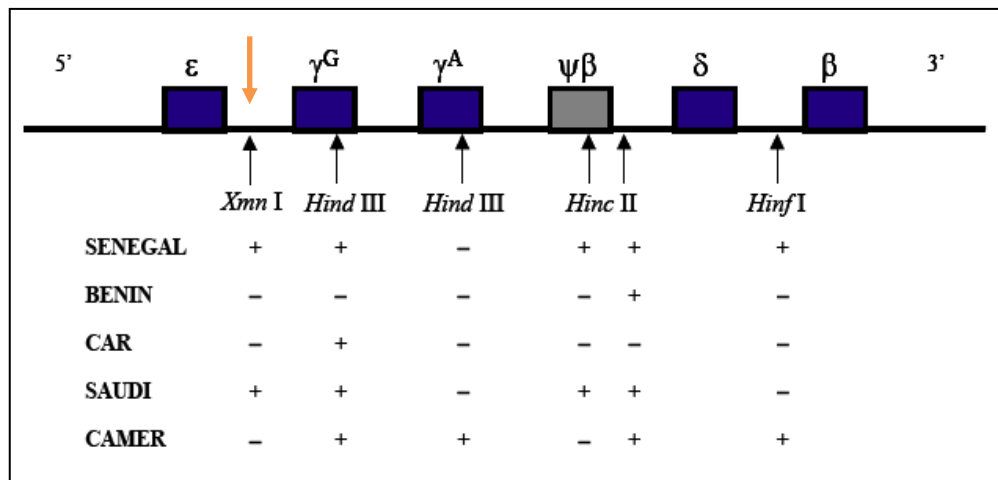


Figura 2. Sítios polimórficos utilizados para classificação dos haplótipos β^S segundo Sutton, Bouhassira, Nagel (1989), com destaque para o sítio *XmnI*.

Na presença desse sítio polimórfico, as taxas de produção das cadeias $\gamma^G:\gamma^A$ atingem valores semelhantes aos encontrados ao nascimento, período em que os níveis das cadeias γ^G estão mais elevados (SAMPIETRO et al., 1992; NEMATİ et al., 2009). Embora esse sítio polimórfico seja conhecido por elevar as concentrações das cadeias γ^G , alguns pesquisadores não verificaram a relação do aumento dessas cadeias com os níveis de Hb F. Ballas et al. (1991) revelaram a associação entre a presença do sítio *XmnI* e o aumento na taxa de cadeias $\gamma^G:\gamma^A$, mas não verificaram aumento significativo nos níveis de Hb F. Tais achados são corroborados por Nematı et al. (2009), que não encontraram relação significativa entre os níveis de Hb F e a presença de *XmnI* em indivíduos iranianos com beta talassemia. De maneira geral, embora a presença do sítio polimórfico *XmnI* mantenha a proporção de cadeias

$\gamma^G:\gamma^A$ próxima aos valores encontrados durante a vida fetal, não há necessariamente um aumento nos níveis de Hb F, sugerindo o envolvimento de outros fatores que regulam os genes da γ -globina (BALLAS et al., 1991).

O polimorfismo *XmnI* é comum em todos os grupos populacionais e apresenta frequência de 32% a 35%, sendo responsável por cerca de um terço da variação genética da β -globina (CAO; MOI, 2000; THEIN, 2004). Essa frequência foi corroborada em estudos realizados por Peri et al. (1997) e Garner et al. (2000b) em populações de origem caucasóide e europeus saudáveis, respectivamente. Entretanto, para populações com hemoglobinas anormais, a frequência do polimorfismo *XmnI* difere do que é relatado para a população saudável. Estudos com pacientes iranianos beta talassêmicos mostraram variação de 39% a 41% na frequência de *XmnI* (KARIMI et al., 2002; NEMATI et al., 2009). Nadkarni et al. (2001) revelaram frequência de 25% em relação à presença desse sítio polimórfico em pacientes beta talassêmicos de origem indiana.

Em relação aos níveis de Hb F associados a esse polimorfismo em indivíduos sem alterações de hemoglobinas, relatos da literatura mostram variação de 2,9% a 5,1% (HUISMAN et al., 1996) e outros trabalhos revelam níveis mais elevados de Hb F para esse polimorfismo, de 2% a 20% (STAMATOYANNOPOULOS; NIENHUIS, 1987).

Efremov et al. (1987) revelaram que a influência do polimorfismo em questão no aumento dos níveis de Hb F é evidente em condições de estresse oxidativo, como ocorre na doença falciforme e na beta talassemia, e que parece não ter influência significativa em indivíduos com Hb AA. Nguyen et al. (2010) verificaram que o polimorfismo *XmnI* apresentou uma forte associação com os níveis de Hb F em indivíduos com talassemia beta intermediária quando comparado à outros QTLs conhecidos por influenciar diretamente o aumento de Hb F. Em relação à anemia falciforme, Belini-Júnior et al. (2010) encontraram um indivíduo adulto, portador dessa afecção genética, que apresentou perfil heterozigoto para o sítio polimórfico *XmnI*. Esse indivíduo não estava sob tratamento com hidroxiureia e os níveis de Hb F verificados foram de 15,8%.

Outros SNPs presentes no *cluster* da β -globina atuam na regulação dos níveis de Hb F. Recentemente, Galarneau et al. (2010), avaliando os principais *loci* gênicos que influenciam os níveis de Hb F em afro-americanos portadores de anemia falciforme, verificaram a presença de um polimorfismo (rs10128556), localizado *downstream* do gene γ^G . Os resultados obtidos por esse grupo de pesquisa sugerem que o SNP rs10128556 consiste na região polimórfica no *cluster* da β -globina que mais influencia a variação nos níveis de Hb F nos indivíduos analisados.

Além disso, elementos presentes no *cluster* do gene do receptor olfatório, localizado *upstream* à região controladora do *locus* (LCR) da β -globina (11p15.4) podem desempenhar papel importante na expressão dos genes γ -globina. Solovieff et al. (2010) mostraram forte associação da Hb F com um polimorfismo na região contendo os genes olfatórios *OR51B5* e *OR51B6*, que explicou 5,6% da variação de Hb F em pacientes afro-americanos portadores de anemia falciforme, sugerindo que os genes do receptor olfatório podem constituir uma região reguladora da expressão de Hb F.

1.8.2 Região 6q23 (*Locus HMIP*) – Cromossomo 6

Estudos recentes mostram que outro *locus* de característica quantitativa, o *HMIP* no cromossomo 6q23, região intergênica do *HBS1L-MYB*, influencia os níveis de Hb F. O gene *HBS1L* está envolvido na regulação de uma gama de processos celulares e é expresso em células da linhagem hematopoética, enquanto que o gene *MYB* está envolvido na oncogênese e desempenha papel essencial no processo de eritropoese (THEIN et al., 2009; WAHLBERG et al., 2009). Acredita-se que a região gênica 6q seja responsável por codificar um fator envolvido na via de maturação eritróide, resultando em aumento nos níveis de células F e Hb F (GARNER et al. 1998). Os resultados obtidos por Garner et al. (1998) evidenciam a influência do QTL 6q23 na modulação dos níveis de Hb F e na produção de células F. No entanto, não está claro se o efeito desse QTL é direto, atuando como um fator que interage com os genes da γ -globina, ou indireto.

Em populações caucasóides, essa região apresenta-se em três blocos de desequilíbrio de ligação, de modo que o bloco 2 está mais fortemente associado com a variação de Hb F. A variabilidade existente no bloco 2 da região *HMIP* parece desempenhar um efeito pleiotrópico em alguns parâmetros hematológicos, em relação à quantidade de células e volume eritrocitário em indivíduos europeus saudáveis. Essa característica sugere que a região intergênica *HBS1L-MYB* contém sequências reguladoras distais que atuam nas linhagens eritróides precursoras (WAHLBERG et al., 2009). A Figura 3 ilustra os três blocos de desequilíbrio de ligação da região 6q23, bem como a relação com diferentes populações.

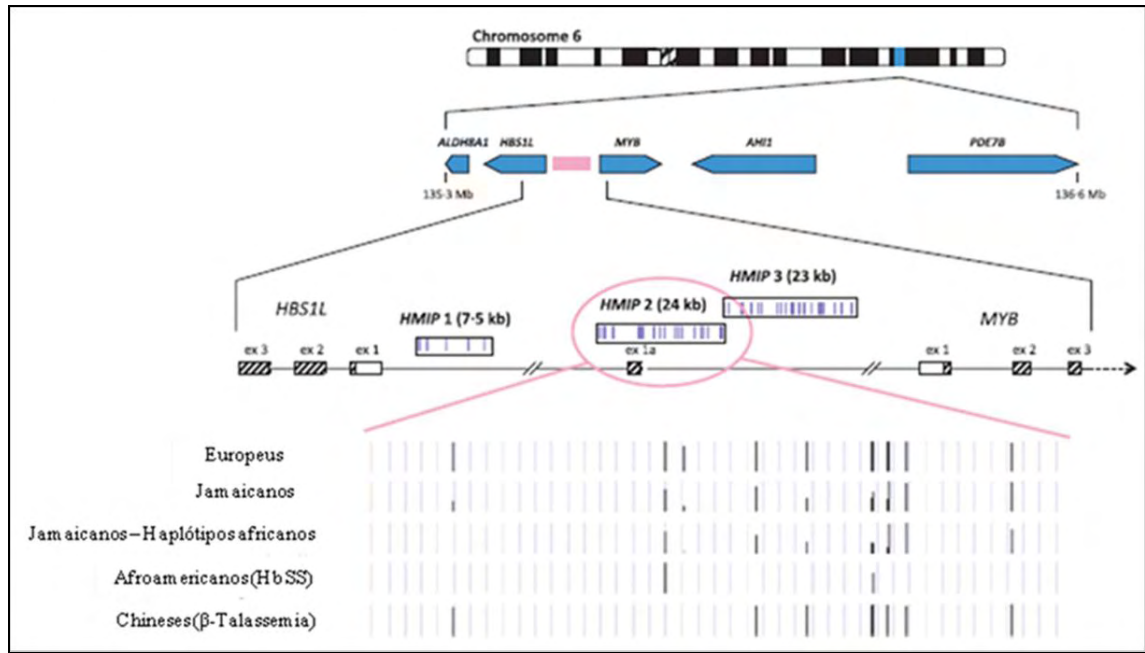


Figura 3. Blocos de desequilíbrio de ligação na região 6q23 e relação existente com diferentes populações (modificado de THEIN; MENZEL, 2009).

Estudos realizados com famílias de origem asiático-indiana identificaram que o *locus* 6q23 apresentava maior associação com os níveis elevados de expressão de Hb F em indivíduos beta talassêmicos. Estes achados revelaram, ainda, que para indivíduos saudáveis e para beta talassêmicos heterozigotos, a presença desse sítio em homozigose estava relacionada com concentrações maiores de Hb F, cujos valores variaram de 1,1% a 3% para os primeiros e de 10% a 24% nos indivíduos com talassemia (CRAIG et al., 1996).

1.8.3 Região 2p16 (*Locus BCL11A*) – Cromossomo 2

Outro *locus* de característica quantitativa associado com níveis elevados de Hb F está localizado na região 2q16, no cromossomo 2. Trabalhos realizados por Menzel et al. (2007) encontraram, além do polimorfismo *XmnI* e do *locus HMIP*, uma terceira região, 2q16, que apresentava associação com os níveis de Hb F e que contribuía com aproximadamente 15% da variação dessa característica em indivíduos normais. Trabalhos realizados em busca de associação com os níveis de Hb F revelaram que o QTL *BCL11A* é o que apresenta relação mais forte com a variação de Hb F (MENZEL et al., 2007; UDA et al., 2008). Avaliando pacientes com talassemia beta maior e intermediária, Uda et al. (2008) verificaram que o QTL *BCL11A* (SNP rs11886868) era mais frequente nos últimos, cujos sintomas clínicos são mais brandos em relação aos primeiros. Lettre et al. (2008) encontraram resultados semelhantes

para pacientes com anemia falciforme, cuja variação de Hb F estava fortemente associada com a presença do QTL *BCL11A*, principalmente em relação aos SNPs rs4671393, rs11886868 e rs7557939.

A partir desses achados, alguns pesquisadores sugerem que o produto do gene *BCL11A*, um fator de transcrição *zinc-finger*, é o mediador central no processo de silenciamento dos genes da γ -globina e da troca de expressão desses genes para os genes β -globina (SANKARAN et al., 2008). Estudos utilizando células K562 mostraram que o *locus BCL11A* se liga a uma região central no promotor do gene γ -globina para formar um complexo repressor atuando, dessa forma, como um agente silenciador na expressão desse gene (CHEN et al., 2009). Estudos realizados por Xu et al. (2010) mostraram que o silenciamento dos genes da γ -globina são resultado da ampla interação que ocorre entre o fator de transcrição BCL11A e a família β -globina, além da interação com a cromatina, na formação de um *looping* cromossômico, em associação com outro fator de transcrição, o SOX6, nos promotores dos genes da γ -globina. Tais achados evidenciam que o BCL11A pode ser considerado um regulador genético no desenvolvimento e controle do silenciamento dos genes da γ -globina em adultos. A Figura 4 ilustra a possível interação que ocorre entre o BCL11A e outros fatores de transcrição no controle do silenciamento dos genes da γ -globina.

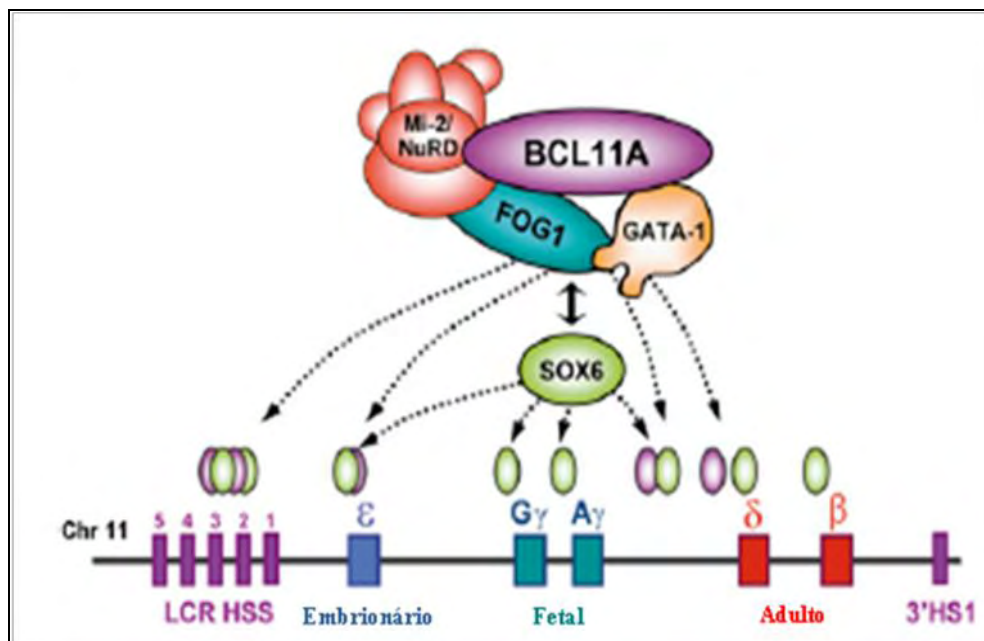


Figura 4. Interação entre fatores de transcrição e BCL11A no silenciamento transcricional dos genes da γ -globina (modificado de XU et al., 2010).

1.8.4 Região Xp22.2 – Cromossomo X

Outra região que influencia os níveis de células F e Hb F é a região Xp22.2. Estudos realizados por Miyoshi et al. (1988), avaliando indivíduos saudáveis, doadores de sangue, de etnia japonesa, verificaram níveis mais elevados de células F em mulheres em relação aos homens. A avaliação familiar revelou que a herança dessa característica quantitativa é dominante e ligada ao cromossomo X.

Dover et al. (1992), estudando indivíduos saudáveis e pacientes com anemia falciforme, de ambos os gêneros, mostraram que a porcentagem de células F presentes em mulheres, saudáveis e doentes, foi significativamente maior. A partir desses achados foi sugerido que regiões localizadas no cromossomo X pudessem ser responsáveis por tal diferença. Em busca dessas regiões, foi localizado um *locus* associado à produção de células F na região Xp22.2. De maneira geral, os resultados encontrados por Dover et al. (1992) sugerem que 70% da variação nos níveis de Hb F em pacientes com anemia falciforme está associado à variação nas porcentagens de células F, que são controladas parcialmente pelo *locus* Xp22.2 no cromossomo X.

1.8.5 Região 8q – Cromossomo 8

Estudos de associação em famílias identificaram um QTL no cromossomo 8, mais precisamente na região 8q, que apresentou ligação com os níveis elevados de células F e Hb F. Nesses indivíduos, a presença desse *locus* estava associada à presença do sítio polimórfico *XmnI*. Pesquisadores sugerem que o QTL 8q pode ser responsável por codificar um fator de regulação que atua como repressor ou ativador transcricional, que se liga diretamente ao sítio *XmnI* ou em regiões próximas a ele (GARNER et al. 2002)¹.

¹ A revisão da literatura em relação aos polimorfismos que influenciam o aumento nos níveis de Hb F, juntamente com resultados obtidos nesse trabalho, foram compilados em artigo e submetido para a Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (ISSN: 1516-8484, Fator de Impacto: 0,3644 – ano base 2009), como sugestão de artigo de revisão intitulado “O que influencia a produção de Hb Fetal na vida adulta?”. O trabalho submetido encontra-se no Apêndice A.

1.9 Haplótipos da β -globina

Haplótipos indicam padrão de combinação de sítios polimórficos nos cromossomos e podem ser definidos como uma associação de vários polimorfismos localizados em famílias gênicas. De maneira geral, os haplótipos da família β -globina refletem a presença de alguns alelos específicos para determinadas populações (ORKIN et al., 1982; SUTTON, et al., 1989). A análise dos haplótipos da família β -globina tem sido utilizada em estudos que envolvem a variabilidade genética e as relações entre populações humanas, em um ponto de vista evolutivo (WAINSCOAT et al., 1986; CHEN et al., 1990; LONG et al., 1990).

Trabalhos realizados por Orkin et al. (1982), em busca de polimorfismos na família β -globina, em indivíduos beta talassêmicos de origem mediterrânea, encontraram sete sítios polimórficos com nove padrões distintos de clivagem, que foram designados haplótipos de número I a IX. A frequência individual de cada um deles variou de 1% a 47% nos cromossomos talassêmicos estudados, com o haplótipo I sendo o mais frequente, seguido pelos haplótipos II e V, e os menos frequentes os haplótipos IV e VIII. De acordo com os pesquisadores, de maneira geral, os padrões polimórficos verificados em indivíduos beta talassêmicos não diferem em frequência dos padrões observados em indivíduos normais de origem européia. A classificação dos haplótipos verificados para os indivíduos beta talassêmicos, segundo Orkin et al. (1982), está representada na Figura 5.

Relatos da literatura mostram a relação existente entre os haplótipos da β -globina e determinadas mutações de beta talassemia. Bezerra (2007), avaliando indivíduos portadores de beta talassemia e interação Hb S/Beta talassemia da região de Pernambuco, verificou as seguintes associações: mutação CD39 (C \rightarrow T) e haplótipo II; mutação IVS-I-1 (G \rightarrow A) e haplótipo V; mutação IVS-I-110 (G \rightarrow A) e haplótipo I; mutação IVS-I-6 (T \rightarrow C) e haplótipo VI; e mutação IVS-I-5 (G \rightarrow C) e haplótipo I. Achados de Kulozik et al. (1991), avaliando indivíduos de origem indiana, corroboram a associação da mutação IVS-I-5 e haplótipo I verificada na população de Pernambuco. Entretanto, estudos realizados em populações da Índia, Líbano, Guadalupe, Ilhas Maurício e Sri Lanka verificaram que essa mutação apresentou relação com a presença do haplótipo VII (KAZAZIAN et al., 1984; VENKATESAN et al., 1992; VARAWALLA et al., 1992; ROMANA et al., 1996; KOTEA et al., 2000; ZAHED et al., 2000; FISHER et al., 2003; MAKHOUL et al., 2005). Em relação à mutação IVS-I-6, Efremov et al. (1994) e Zahed et al. (2000) encontraram associação com o

haplótipo VII em populações de origem portuguesa e libanesa, respectivamente, diferindo dos achados para a população pernambucana.

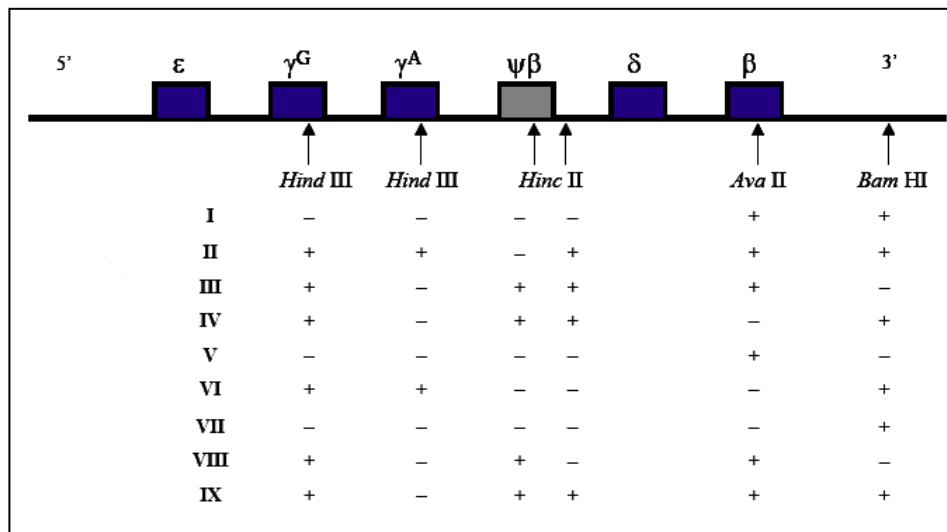


Figura 5. Sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β -globina segundo Orkin et al. (1982).

Na tentativa de compreender o perfil de hemoglobina fetal aumentada em indivíduos sem queixa de anemia e sintomas hematológicos, e contribuir para o conhecimento dos fatores que influenciam a expressão dessa hemoglobina na vida adulta, foi desenvolvido o trabalho de Iniciação Científica intitulado “Delta-beta Talassemia e Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal: relação com a presença de Hb F aumentada”, no qual foram avaliadas as frequências de duas mutações de PHHF de origem africana, PHHF-1 (Black) e PHHF-2 (Ghana) em um grupo de indivíduos com Hb F aumentada da região Sudeste do país. Visto que a expressão dos genes da γ -globina é influenciada por outros fatores além das mutações para a PHHF, foi necessário dar continuidade ao estudo, para avaliar as mutações e polimorfismos que pudessem estar relacionados à produção de Hb F nesse grupo. Dessa forma, estimou-se que a presença de Hb F aumentada em indivíduos saudáveis e sem queixas de anemia pudesse ser resultante da influência de mutações para a $\delta\beta$ -Talassemia, do polimorfismo *Xmn*I e de haplótipos da β -globina, relacionados às diferentes etnias formadoras da população avaliada.

Objetivos

2 Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Verificar a presença e a frequência de mutações para a $\delta\beta$ -Talassemia (Siciliana e Espanhola), do polimorfismo *XmnI* (-158 C \rightarrow T) e dos haplótipos da β -globina em indivíduos saudáveis e sem queixas de anemia, com Hb F aumentada.

2.2 Objetivos Específicos

Em um grupo de indivíduos com Hb F aumentada:

1. Avaliar a presença das mutações $\delta\beta$ -Talassemia Siciliana e $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola por meio da técnica de Gap-PCR;
2. Avaliar a presença do polimorfismo *XmnI*, na posição 158 da região promotora do gene γ^G (C \rightarrow T);
3. Avaliar o padrão de combinação dos polimorfismos para os haplótipos da β -globina por meio de técnicas de PCR-RFLP;
4. Estabelecer as possíveis relações entre a presença dos polimorfismos e as concentrações de Hb F.

Material e Métodos

3 Material

3.1 Casuística

Consistiu de 60 amostras de sangue periférico, colhidas com EDTA como anticoagulante, estocadas no LHGDH (Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas), UNESP, com perfil eletroforético e cromatográfico (HPLC) com Hb F aumentada, de indivíduos adultos não aparentados, de ambos os gêneros, sem clínica ou queixas de anemias, provenientes do estado de São Paulo. As amostras que compuseram essa casuística foram utilizadas no projeto de Mestrado intitulado “Análise quantitativa e molecular de hemoglobina fetal em doadores de sangue” (ZAMARO, 2002), a partir de um montante de 208 amostras, que foram codificadas e as suas identificações são do conhecimento apenas dos responsáveis pela pesquisa, preservando a identidade dos participantes.

3.2 Caracterização das amostras:

As amostras componentes da casuística foram utilizadas no projeto de Iniciação Científica intitulado “Delta-beta Talassemia e Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal: relação com a presença de Hb F aumentada”, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Ibilce/Unesp, em 2007.

O total de 60 amostras foi dividido em dois grupos de estudo, de acordo com as concentrações de Hb F em: grupo I, composto por 34 amostras (19 mulheres e 15 homens) com concentrações de Hb F variando de 2% a 15%; e grupo II, composto por 26 amostras (12 mulheres e 14 homens) com concentrações de Hb F acima de 15,0%. A classificação das amostras foi determinada conforme as concentrações dessa hemoglobina descritas pela literatura. Para as mutações de PHHF esse valor varia de 16,0% a 30,0% e para $\delta\beta$ -Talassemia de 4,0% a 18,6% (HUISMAN et al., 1996).

Os resultados obtidos nesse trabalho foram compilados em um artigo científico, que foi submetido à revista *Genetics and Molecular Research* (ISSN: 1676-5680; Fator de Impacto: 0,682). O referido artigo se encontra no Apêndice B.

3.3 Considerações Éticas

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE) sob o protocolo número 013/10 e CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) 0027.0.229.000-09, obedecendo aos princípios estabelecidos na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Os resultados foram globais e não identificaram os indivíduos. Estão à disposição dos interessados, considerando que são saudáveis e sem queixas. Não houve intercorrência de característica ética durante todo o desenvolvimento do trabalho.

3.4 Análise Estatística

Foram utilizados o Teste do Qui-Quadrado (χ^2) e o Teste t de Student para comparação dos níveis de Hb F na presença e ausência dos polimorfismos avaliados e na comparação entre os dois grupos avaliados. O software utilizado nas análises foi o Statistica 8.0. Foram admitidos como estatisticamente significantes valores de $p \leq 0,05$.

3.5 Métodos

As amostras foram submetidas aos testes clássicos de diagnóstico de hemoglobinopatias e testes complementares para quantificação das frações de Hb F. Os protocolos utilizados para a realização de tais testes encontram-se em anexo. A Figura 6 ilustra o fluxograma de realização desses testes.

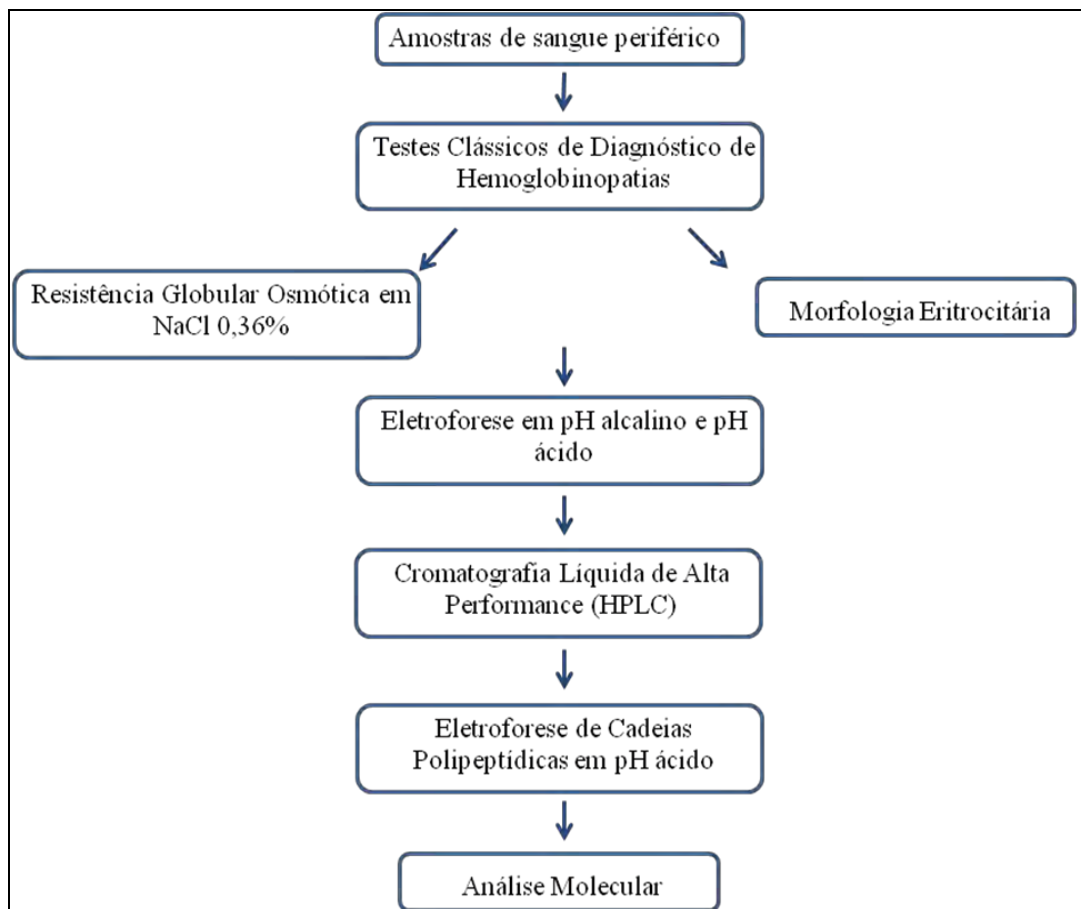


Figura 6. Fluxograma de testes de triagem básica e testes complementares para perfil de hemoglobinas, aos quais as amostras foram submetidas. Os protocolos detalhados encontram-se no Anexo 1.

3.5.1 Análises Moleculares

Para o início das análises moleculares objetivou-se primeiramente a preparação das amostras, conforme segue:

1 - Extração de DNA de sangue periférico por meio de fenol-clorofórmio (modificado por BONINI-DOMINGOS, 2006):

Princípio:

Este método promove a extração de DNA genômico de sangue periférico utilizando-se fenol/clorofórmio e precipitação com etanol. Neste procedimento, as proteínas contaminantes sofrem desnaturação e são mantidas na fase orgânica ou na interface entre as fases orgânica e aquosa, enquanto que os ácidos nucleicos permanecem na fase aquosa. Adiciona-se álcool isoamílico ao fenol/clorofórmio durante a extração do DNA. A adição de etanol faz com que

os sais e outros solutos, como os resíduos da extração com fenol/clorofórmio, permaneçam em solução, enquanto os ácidos nucleicos precipitam-se e podem ser separados facilmente por centrifugação. O DNA obtido nesse processo é adequado para aplicação em métodos de biologia molecular como a amplificação por PCR.

Reagentes:

1. Solução de lise 1 para extração de DNA (tampão utilizado na lise de células vermelhas):

- Sacarose 0,32 M.....10,95 g
- Tris HCl 10 mM.....1,0 mL
- MgCl₂ 5 mM.....0,5 mL
- Triton 1% 100x.....1,0 mL
- Água ultrapura autoclavada100 mL
- Dissolver bem e armazenar em geladeira.

2. Solução de lise 2 para extração de DNA (tampão utilizado na lise de células brancas):

- 0,075 M de NaCl.....2,19 g
- 0,02 M de EDTA (solução estoque pH 8,0).....20 mL
- Água ultrapura autoclavada.....500 mL
- Autoclavar e armazenar em geladeira.

3. Proteinase K (20 mg/mL):

- Proteinase K.....20 mg
- Água ultrapura autoclavada.....1 mL
- Conservar em freezer.

4. Clorofórmio/ álcool isoamílico 24:1:

- Clorofórmio.....24 mL
- Álcool isoamílico.....1 mL

5. SDS 10%:

- SDS.....10 g
- Água ultrapura autoclavada.....100 mL
- O sal deve ser colocado aos poucos. Não autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

6. Etanol 70%

7. KCl 2M:

$$M = \frac{m}{P.M (g) \times V (L)}$$

Para KCl de peso molecular 74,55g, usar 14,91g diluído em 100 mL (0,1 L) de água ultra pura autoclavada.

Protocolo para extração de DNA:

1. Colocar 500 µL de sangue periférico, colhido com EDTA, em um tubo *ependorf* e completar o volume para 1,5 mL com solução de lise 1 e homogeneizar.
2. Centrifugar por cinco minutos a 6500 rpm (rotações por minuto).
3. Descartar o sobrenadante, deixando aproximadamente 300 µL de pellet.
4. Completar para 1 mL com solução de lise 1, homogeneizar até desfazer o pellet e deixar descansar por 10 – 15 minutos.
5. Centrifugar por cinco minutos a 6500 rpm.
6. Descartar o sobrenadante.
7. Repetir as etapas 4, 5 e 6.
8. Acrescentar ao pellet 450 µL de solução de lise 2, ressuspender e adicionar 25 µL de SDS a 10 % e 5 µL de proteinase K (20 mg/mL) e homogeneizar.
9. Incubar em banho-maria a 37° C *overnight* ou 42° C por 3 horas.
10. Adicionar 500 µL de fenol e homogeneizar.
11. Centrifugar por 5 minutos a 6500 rpm.
12. Transferir a fase superior para outro tubo e adicionar 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24: 1).
13. Homogeneizar e centrifugar por 5 minutos a 6500 rpm.
14. Repetir as etapas 12 e 13.

15. Transferir o sobrenadante para outro tubo contendo 50 μL de KCl gelado e adicionar 500 μL de etanol 100% gelado. Inverter o tubo várias vezes até precipitar o DNA.
16. Centrifugar aproximadamente 30 segundos a 14.000 rpm.
17. Desprezar o sobrenadante e lavar o DNA, que ficou aderido no tubo, com 200 μL de etanol 70 % gelado, e centrifugar aproximadamente 30 segundos a 14.000 rpm.
18. Desprezar delicadamente o sobrenadante e deixar secar por 15 minutos.
19. Re-hidratar o DNA com 50 μL de água ultrapura, deixando *overnight* em temperatura ambiente ou em banho-maria a 37° C, para total solubilização da amostra.
20. Estocar as amostras a – 20° C.

2 - Quantificação de DNA:

Após o procedimento de extração, todas as amostras de DNA foram quantificadas, com a finalidade de avaliar as concentrações e a qualidade/pureza do DNA obtido, por meio do cálculo da absorbância de acordo com a proporção 260/280 nm, que equivale ao comprimento de onda em que o DNA e as proteínas absorvem luz, respectivamente. O equipamento utilizado foi o Espectrofotômetro Nanodrop™ – 1000, que requer apenas 2 μL de amostra para o procedimento. Foram consideradas como suficientes para a amplificação, concentrações de DNA acima de 100 ng/ μL e qualidade/pureza acima de 1,80, já que valores inferiores a este apresentam contaminação com proteínas (EMBRAPA, 2007).

3 - Amplificação:

A técnica de PCR é utilizada para a amplificação do DNA e, para isso, utiliza-se uma reação enzimática catalisada pela enzima polimerase que, para uma atividade adequada, requer a presença de íons Mg^{++} . O processo ocorre em três etapas determinadas por oscilações de temperatura: desnaturação do DNA, anelamento dos iniciadores e extensão.

3.1. Gap-PCR (OLD et al., 2005)

A técnica de Gap-PCR é utilizada para detectar mutações deletionais no gene da β -globina como as PHHF e as Delta-Beta Talassemias. Entretanto, essa técnica é apenas possível para as deleções em que os pontos de quebra já estão bem definidos, como é o caso de três mutações para a PHHF (PHHF-1 (Black), PHHF-2 (Ghana) e PHHF-3 (India), e de

seis mutações para a $\delta\beta$ -Talassemia (Chinesa, Siciliana, Espanhola, Vietnamita/Asiática, Turca e Indiana) (CRAIG et al., 1994).

Foram selecionadas para avaliação neste trabalho as mutações $\delta\beta$ -Talassemia Siciliana e $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola. A escolha destas mutações fundamentou-se na miscigenação da população brasileira, principalmente em relação à etnia européia. O protocolo para realização de Gap-PCR foi baseado no estudo desenvolvido por Craig et al. (1994), com modificações adequadas às nossas condições de análise. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a análise da $\delta\beta$ -Talassemia Siciliana foram descritos por Craig et al. (1994) e para a $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores descritos por Vives-Corrns et al. (1991). Esses oligonucleotídeos foram testados no programa *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) a fim de verificar a viabilidade da utilização dos mesmos em nosso estudo.

- $\delta\beta$ -Talassemia Siciliana:

F1: 5' – TTGGGTTTCTGATAGGCACTG – 3'

F2: 5' – GTGTCACCCATTAATGCCTTGAC – 3'

F3: 5' – TAGATCCCTTTGCCATTATG – 3'

- $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola:

N1: 5' – ATGGGTATTTCACTTGTTAT – 3'

N2: 5' – ACTTTGTCTGTTAATTCCAA – 3'

N3: 5' – ACTGTGGAGCCCCTTTCTG – 3'

3.2. PCR-RFLP

A determinação do polimorfismo *XmnI* e dos haplótipos da β -globina foi realizada por PCR-RFLP. O sítio polimórfico *XmnI* foi analisado de acordo com Sutton, Bouhassira, Nagel (1989) e para os haplótipos β -globina foram analisados seis sítios polimórficos, conforme Orkin et al., (1982). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para análise dos polimorfismos do *cluster* β -globina foram descritas por Sutton, Bouhassira, Nagel (1989) e Miranda et al., (1997), e estão listadas na Tabela 3. Tais sequências foram testadas no programa *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) a fim de verificar a viabilidade da utilização dos mesmos em nosso estudo.

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de regiões da família β -globina.

<i>Primer</i>	<i>Sequência do primer (5' – 3')</i>	<i>Direção</i>	<i>Região</i>
**H0	AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	→	5' γ^G
**H1	AGGAGCTTATTGATAACTCAGAC	←	
**H2	AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	←	γ^G
**H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	
**H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	γ^A
**H4	TAAATGAGGAGCATGCACACAC	←	
**H5	GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	→	$\psi\beta$
**H6	ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	←	
**H7	TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	→	3' $\psi\beta$
**H8	GGACCCTAACTGATATAACTA	←	
*P1	TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG	→	β
*P5	TCATTCGTCTGTTTCCCATTC	←	
**SF1	GCTCTACGGATGTGTGAGAT	→	3' β
**SF2	GCCCACATCACCAAGGCAAT	←	

→: sense ; ← anti-sense.

* oligonucleotídeos iniciadores desenvolvidos por Miranda et al. (1997).

** oligonucleotídeos iniciadores desenvolvidos por Sutton, Bouhassira, Nagel (1989).

3.3. Padronização da Metodologia

Foram realizados testes iniciais de amplificação referentes a duas mutações de $\delta\beta$ -Talassemia, previamente selecionadas. A Tabela 4 exemplifica as misturas de reação e a Tabela 5 mostra a ciclagem utilizada para as mutações $\delta\beta$ -Talassemia Siciliana e para a $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola. O tamanho dos fragmentos obtidos após amplificação do produto de reação estão sumarizados na Tabela 6.

Tabela 4. Misturas de reação de amplificação para identificação das mutações $\delta\beta$ -Talassemia Siciliana e $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola.

Reagentes	$\delta\beta$ -Talassemia Siciliana	$\delta\beta$ -Talassemia Espanhola
H ₂ O mili-Q	7,85 uL	7,70 uL
Tampão Tris-HCl (10 mM)	2,50 uL	2,50 uL
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 uL	1,00 uL
dNTP (1,25 mM)	4,00 uL	4,00 uL
DMSO 30%	1,00 uL	1,00 uL
Primer F1/N1 (10 mM)	2,50 uL	2,50 uL
Primer F2/N2 (10 mM)	2,50 uL	2,50 uL
Primer F3/N3 (10 mM)	2,50 uL	2,50 uL
Taq polimerase (5U)	0,40 uL	0,30 uL
DNA (200 ng)	1,00 uL	1,00 uL
Volume final	25,00 uL	25,00 uL

Tabela 5. Ciclagem das reações de PCR para as duas mutações de $\delta\beta$ -Talassemia analisadas.

Etapas	$\delta\beta$ -Talassemia Siciliana	$\delta\beta$ -Talassemia Espanhola
Desnaturação Inicial	4 minutos a 94° C	4 minutos a 94° C
Desnaturação	1 minuto a 94° C	1 minuto a 94° C
Anelamento	1 minuto a 60° C	1 minuto a 60° C
Extensão	2 minutos a 72° C	1 minuto a 72° C
Extensão Final	10 minutos a 72° C	10 minutos a 72° C

Tabela 6. Tamanho dos fragmentos referentes às duas mutações avaliadas.

Tamanho do Fragmento	$\delta\beta$ -Talassemia Siciliana	$\delta\beta$ -Talassemia Espanhola
Normal	1585 pb	685 pb
Mutante	1150 pb	299 pb

Legenda: pb = pares de base.

Os reagentes, a concentração utilizada para a montagem da mistura de PCR e as condições de amplificação para análise do polimorfismo *XmnI* e dos haplótipos β -globina estão representadas nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7. Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas da família β -globina.

Componentes	Volumes (μL)				
	<i>Xmn</i> I 5' γ^G	<i>Hind</i> III γ^G e γ^A	<i>Hinc</i> II $\Psi\beta$ e 3' $\psi\beta$	<i>Ava</i> II β	<i>BamH</i> I 3' β
Tampão (10X)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl ₂ (50 mM)	1,25	1,0	1,0	1,0	1,0
dNTP's (2 mM)	2,5	-	-	-	-
dNTP's (10 mM)	-	0,75	0,75	0,5	0,5
Primer 5' (10 μM)	-	0,5	0,5	0,5	0,5
Primer 3' (10 μM)	-	0,5	0,5	0,5	0,5
Primer 5' (25 μM)	0,25	-	-	-	-
Primer 3' (25 μM)	0,25	-	-	-	-
<i>Taq</i> Polimerase (5U/ μL)	0,125	0,25	0,25	0,15	0,15
DNA (100 ng/ μL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
H ₂ O	17,125	18,5	18,5	18,35	18,35
Volume Final (μL)	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0

Tabela 8. Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas da família β -globina.

Região	Desnaturação Inicial		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão Final	
			35 ciclos							
	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo
5' γ^G	94	5'	94	45''	60	45''	72	1'30''	72	7'
γ^G	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
γ^A	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
$\Psi\beta$	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
3' $\psi\beta$	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
β	96	2'	96	30''	58	1'	72	1'	72	7'
3' β	96	2'	96	30''	58	1'	72	1'	72	7'

O produto da PCR foi digerido a 37°C durante 3 horas, com endonucleases de restrição específicas para cada sítio polimórfico. Cada amostra foi marcada pela presença (+) ou ausência (-) dos sítios de restrição. O tamanho dos produtos de amplificação e após clivagem, podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9. Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição.

<i>Primer</i>	<i>Enzima</i>	<i>Região</i>	Fragmento amplificado	Fragmento após a clivagem
H0 e H1	<i>Xmn</i> I	5' γ^G	657 pb	450 pb + 200 pb
H2 e H3	<i>Hind</i> III	γ^G	780 pb	430 pb + 340 pb + 10 pb
H3 e H4	<i>Hind</i> III	γ^A	760 pb	400 pb + 360 pb
H5 e H6	<i>Hinc</i> II	$\psi\beta$	701 pb	360 pb + 340 pb + 1 pb
H7 e H8	<i>Hinc</i> II	3' $\psi\beta$	590 p b	470 pb + 120 pb
P1 e P5	<i>Ava</i> II	β	763 pb	449 pb + 214 pb + 103 pb
SF1 e SF2	<i>Bam</i> HI	3' β	1520 pb	1228 pb + 292 pb

Legenda: pb = pares de bases.

O produto de digestão foi visualizado no Sistema de Captura de imagem L-PIX Touch (Loccus Biotecnologia). A Figura 7 mostra uma imagem do gel de agarose para um dos sítios polimórficos analisados.

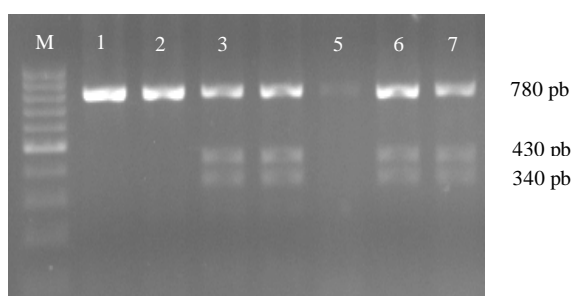


Figura 7. Foto do gel de agarose 1,5% mostrando os fragmentos de DNA obtidos após a digestão enzimática para a região γ^G . M (Marcador molecular 100 pares de base). Linhas 1 e 2 representam indivíduos com ausência do sítio de restrição. Linhas 3, 4, 6 e 7 representam indivíduos com presença do sítio em um cromossomo e ausência no outro. Linha 5 representa um fragmento não amplificado e digerido. O fragmento de 10 pb não é visível nesse gel de agarose.

Resultados

4 Resultados

4.1 Análise da presença das mutações $\delta\beta$ -Talassemia Siciliana e $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola

Dentre as 60 amostras analisadas, foram encontrados três indivíduos heterozigotos (5,0%) para a mutação $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola. Nenhum indivíduo apresentou a mutação $\delta\beta$ -Talassemia Siciliana. Os três indivíduos heterozigotos para a $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola eram do gênero masculino e apresentaram níveis de Hb F equivalentes a 9,6%, 9,8% e 10,7%. Comparando esses resultados com os previamente obtidos para PHHF para o mesmo grupo (Apêndice C), foi possível verificar que as mutações de PHHF foram mais frequentes que as de $\delta\beta$ -Talassemia no grupo avaliado, conforme mostrado na Tabela 10. Os resultados obtidos da análise das mutações de $\delta\beta$ -Talassemia foram somados aos resultados encontrados para as mutações de PHHF e estão compilados no artigo científico que se encontra no Apêndice B desse trabalho.

Tabela 10. Distribuição das mutações para PHHF e $\delta\beta$ -Talassemia nos dois grupos de estudo, separados com base na quantidade de Hb F.

Mutação	Grupo I*	Grupo II**	Total
PHHF-1 (Black)	-	2	2
PHHF-2 (Ghana)	1	13	14
$\delta\beta$ -Talassemia Espanhola	3	-	3
$\delta\beta$ -Talassemia Siciliana	-	-	-
Total	4	15	19

Legenda: * = Hb F variando de 2,0% a 15,0% do total de hemoglobinas.

** = Hb F acima de 15,0% do total de hemoglobinas.

Em relação às mutações de PHHF e $\delta\beta$ -Talassemia avaliadas, no grupo I foram encontradas quatro amostras heterozigotas para alguma das mutações investigadas (21%), enquanto que no grupo II as amostras com perfil heterozigoto totalizaram 15 indivíduos (79%), somente para as mutações de PHHF. Os resultados provenientes da análise estatística mostraram que houve diferença significativa em relação à presença das mutações avaliadas nos grupos amostrados ($p=0,0001$; $\chi^2=14,36$). A maioria das amostras com perfil heterozigoto para alguma das mutações avaliadas estava presente no grupo com níveis de Hb F acima de

15% (grupo II). A Figura 8 ilustra a distribuição das amostras com perfil heterozigoto para as mutações de PHHF e $\delta\beta$ -Talassemia nos dois grupos de estudo, segundo os valores de Hb F.



Figura 8. Número de amostras heterozigotas para as mutações de PHHF e $\delta\beta$ -Talassemia avaliadas em relação aos grupos de estudo, com destaque para presença de ambas as mutações no grupo I e predominância da mutação PHHF no grupo II.

4.2 Presença do polimorfismo *XmnI* (- 158 C \rightarrow T)

Do montante de 60 amostras, 20 (33,3%) apresentaram o sítio polimórfico *XmnI*, com níveis de Hb F variando de 2,0% a 33,3%. Dentre as amostras que apresentaram esse polimorfismo, duas (3,33%) apresentaram perfil homozigoto, com níveis de Hb F iguais a 2,0% e 22,0%, e 18 (30,0%) foram heterozigotas, cujos níveis médios de Hb F foram de $15,87 \pm 11,80\%$, com variação de 2,9% a 33,3%. A Tabela 11 mostra os valores de Hb F, as diferentes populações estudadas, hemoglobinopatia associada e presença do polimorfismo *XmnI*, incluindo os resultados desse trabalho.

A análise estatística não revelou diferença significativa ($p=0,63$) acerca dos valores médios de Hb F para indivíduos que apresentaram o polimorfismo ($15,48 \pm 11,69\%$) e indivíduos sem a mutação ($17,46 \pm 11,68\%$) para o grupo avaliado. A Tabela 12 evidencia os valores médios de Hb F em amostras com a presença e ausência do polimorfismo *XmnI*. A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos para o sítio polimórfico *XmnI* em relação aos grupos amostrados e os genótipos encontrados nesse estudo.

Tabela 11. Frequência do polimorfismo *XmnI* e níveis de Hb F em diferentes populações saudáveis e com alterações de hemoglobinas, de origem étnica variada.

Frequência do polimorfismo <i>XmnI</i> (%)	População estudada	Níveis de Hb F	Fenótipo expresso	Referência
14%	Hong Kong	0,22 ± 0,03 g/dL	Talassemia beta heterozigota	Gibney et al., 2008
14%	Caucasóide	0,34% - 1,07%	Saudáveis	Sampietro et al., 1992
3,3%	Arábia Saudita (Sudoeste)	9,3% ± 5,8%	Anemia falciforme	El-Hazmi, 1989
93,2%	Arábia Saudita (Oriente)	11,3% ± 6,2%		
39% - 41%	Irã	NA	Talassemia beta intermediária	Karimi et al., 2002
25%	Índia	NA	Talassemia beta maior e intermediária	Nadkarni et al., 2001
88,1%	Irã	63,0% ± 15,59%	Talassemia beta intermediária	Neishabury et al., 2010
70,5%	Irã	NA	Talassemia beta maior	Neishabury et al., 2010
33,3%	Brasil	15,48% ± 11,69%	Saudáveis com Hb F aumentada	Carrocini; Bonini-Domingos, 2011 (presente estudo)

Legenda: NA = não avaliado.

Tabela 12. Valores médios de Hb F em relação à presença e ausência do polimorfismo *XmnI*.

Polimorfismo <i>XmnI</i>	Hb F média ± DP (min – máx)	Valor de p*	Total N (%)
Presença	15,48 ± 11,69 (2,0 – 33,3)	0,63	20 (33,3%)
Ausência	17,46 ± 11,68 (2,9 – 39,2)		40 (66,7%)

Legenda: DP = desvio padrão; (min – máx) = valores mínimo e máximo; N = número amostral. Valor significativo = $p \leq 0,05$ (* Teste t de Student).

Tabela 13. Distribuição dos genótipos para o polimorfismo *XmnI* nos dois grupos de estudo.

Genótipo <i>XmnI</i>	Grupo I	Grupo II	Total
			N (%)
(+/+)	1	1	2 (3,33%)
(+/-)	11	7	18 (30,0%)
(-/-)	22	18	40 (66,7%)
Total	34	26	60 (100%)

Legenda: (+/+) homozigose para o sítio polimórfico *XmnI*; (+/-) heterozigose para o sítio polimórfico *XmnI*; (-/-) ausência do polimorfismo.

Em relação à presença desse sítio polimórfico nos dois grupos analisados, foram encontradas 12 amostras (60%) positivas no grupo I e oito amostras (40%) no grupo II. A análise estatística não revelou diferença significativa em relação à presença desse polimorfismo nos grupos de estudo ($\chi^2=0,135$; $p=0,71$).

Dentre as amostras que apresentaram o sítio polimórfico *XmnI*, três eram heterozigotas para as mutações de PHHF, uma para a PHHF-1 e duas para a PHHF-2. Somente uma amostra apresentou perfil heterozigoto para a $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola. Os níveis de Hb F variaram de 20,9% a 29,0% para as primeiras (PHHF) e foi de 10,2% para a última ($\delta\beta$ -Talassemia Espanhola). Tais resultados são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14. Presença do polimorfismo *XmnI* em amostras heterozigotas para as mutações de PHHF e $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola.

Mutações	Polimorfismo <i>XmnI</i>		Total
	(+/-)	(+/+)	
PHHF-1 (Black)	1	1	2
PHHF-2 (Ghana)	1	-	1
$\delta\beta$ -Talassemia Espanhola	1	-	1
Total	3	1	4

Legenda: (+/-) heterozigose para o polimorfismo *XmnI*; (+/+) homozigose para o polimorfismo *XmnI*.

4.3 Identificação dos padrões de combinação dos haplótipos β -globina

A análise dos haplótipos β -globina foi utilizada para a possível identificação da origem desses alelos na população avaliada. Para os haplótipos β -globina foram analisados seis sítios polimórficos. O montante de amostras utilizadas para avaliação dos haplótipos de β -globina foi de 51 amostras, sendo 30 do grupo I e 21 do grupo II.

Foram encontrados 18 tipos de haplótipos, sendo cinco com padrão de combinação típico (I, II, III, V, IX) e mais 13 haplótipos atípicos, com padrões distintos de digestão. Os sítios polimórficos dos haplótipos atípicos estão representados na Tabela 15, e foram classificados por números de 1 a 13, visto que cada um deles possui uma combinação de sítios polimórficos únicos que não se enquadram na classificação previamente descrita por Orkin et al. (1982).

Tabela 15. Caracterização dos alelos atípicos dos haplótipos β -globina.

Haplótipo β - globina	<i>Hind III</i>		<i>Hinc II</i>		<i>Ava II</i>	<i>BamH I</i>
	γ^G	γ^A	$\Psi\beta$	$3'\psi\beta$	β	$3'\beta$
Atp 1	+	-	-	+	+	+
Atp 2	-	-	-	+	+	-
Atp 3	+	-	-	-	+	+
Atp 4	-	-	-	+	+	+
Atp 5	-	-	+	+	+	+
Atp 6	-	+	+	+	+	+
Atp 7	+	-	+	-	+	+
Atp 8	-	-	+	-	+	+
Atp 9	-	-	-	-	-	-
Atp 10	+	+	+	-	+	+
Atp 11	+	-	-	+	+	-
Atp 12	-	+	-	-	+	+
Atp 13	-	-	+	-	+	-

Legenda: Atp = atípico; (+) presença do sítio polimórfico; (-) ausência do sítio polimórfico.

Em relação à distribuição genotípica dos haplótipos β -globina avaliados, foram encontrados 27 padrões de combinação distintos, sendo mais frequentes o Atp1/Atp2 (13,7%), seguido por Atp1/V (9,8%) e Atp4/V (7,8%). Os padrões genotípicos de combinação para as 51 amostras são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Frequência genotípica dos haplótipos β -globina nos grupos de estudo.

Haplótipos β -globina	Grupo I	Grupo II	N (%)
Atp1/Atp2	2	5	7 (13,72%)
Atp1/V	3	2	5 (9,80%)
Atp4/V	4	-	4 (7,84%)
Atp3/V	3	-	3 (5,88%)
II/Atp2	1	2	3 (5,88%)
I/V	-	3	3 (5,88%)
Atp12/V	-	3	3 (5,88%)
Atp7/V	2	-	2 (3,92%)
Atp8/V	2	-	2 (3,92%)
Atp5/V	2	-	2 (3,92%)
IX/I	1	-	1 (1,96%)
Atp5/I	1	-	1 (1,96%)
Atp6/V	1	-	1 (1,96%)
Atp4/I	1	-	1 (1,96%)
Atp7/I	1	-	1 (1,96%)
Atp3/I	1	-	1 (1,96%)
Atp7/Atp9	1	-	1 (1,96%)
I/Atp9	1	-	1 (1,96%)
Atp10/V	1	-	1 (1,96%)
IX/V	1	-	1 (1,96%)
Atp2/V	1	-	1 (1,96%)
Atp11/Atp11	-	1	1 (1,96%)
Atp7/Atp13	-	1	1 (1,96%)
Atp8/Atp13	-	1	1 (1,96%)
Atp4/Atp2	-	1	1 (1,96%)
III/Atp2	-	1	1 (1,96%)
Atp11/Atp2	-	1	1 (1,96%)
Total	30	21	51 (100%)

Legenda: Atp = Atípico; N = número amostral.

Dos 27 genótipos verificados nas amostras analisadas, apenas três (11,1%) estiveram presentes em ambos os grupos de estudo: Atp1/Atp2, Atp1/V e II/Atp2. Para o grupo I foram encontrados 16 (59,3%) padrões genotípicos distintos e para o grupo II foram verificados oito (29,6%) genótipos, não encontrados no primeiro grupo.

Do total de 102 cromossomos analisados, foram identificados para os haplótipos β -globina 28 (27,45%) alelos do tipo V, nove (8,82%) do tipo I, três (2,94%) do tipo II, dois (1,96%) do tipo IX e um (0,98%) do tipo III. Dentre os padrões atípicos identificados, os mais frequentes foram os tipos Atp2 (13,72%), Atp1 (11,76%), Atp4 (5,88%), Atp7 (4,9%) e Atp3 (3,92%), conforme mostrado na Tabela 17.

Tabela 17. Frequência dos alelos β -globina e distribuição nos grupos de estudo.

Haplótipos β -globina	Grupo I	Grupo II	N (%)
I	6	3	9 (8,82%)
II	1	2	3 (2,94%)
III	-	1	1 (0,98%)
V	20	8	28 (27,45%)
IX	2	-	2 (1,96%)
Atp 1	5	7	12 (11,76%)
Atp 2	4	10	14 (13,72%)
Atp 3	4	-	4 (3,92%)
Atp 4	5	1	6 (5,88%)
Atp 5	3	-	3 (2,94%)
Atp 6	1	-	1 (0,98%)
Atp 7	4	1	5 (4,9%)
Atp 8	2	1	3 (2,94%)
Atp 9	2	-	2 (1,96%)
Atp 10	1	-	1 (0,98%)
Atp 11	-	3	3 (2,94%)
Atp 12	-	3	3 (2,94%)
Atp 13	-	2	2 (1,96%)
Total	60	42	102 (100%)

Legenda: Atp = atípico; N = número amostral.

Dos 18 alelos diferentes encontrados, oito (44,5%) estiveram presentes em ambos os grupos de estudo. Os alelos IX, Atp3, Atp5, Atp6, Atp9 e Atp10 (33,3%) foram observados apenas em amostras componentes do grupo I, enquanto que os alelos III, Atp11, Atp12 e Atp13 (22,2%) foram encontrados somente no grupo II.

Com base nos resultados obtidos em relação à frequência alélica dos haplótipos β -globina nos dois grupos amostrados, a diferença verificada em relação aos alelos V e Atp2 foram submetidas à análise estatística, devido à distinção evidente dos mesmos em cada grupo de estudo. A análise revelou diferença significativa para ambos os alelos, sendo o tipo V mais frequente no grupo I ($\chi^2=4,072$; $p=0,043$) e o tipo Atp2 com maior frequência no grupo II ($\chi^2=7,29$; $p=0,007$).

A relação entre a expressão em porcentagem da Hb F correspondente ao haplótipo β -globina herdado é apresentada na Tabela 18.

Tabela 18. Níveis de Hb F de acordo com os haplótipos β -globina.

Haplótipos β -globina	N	Hb F (%) (mín - máx)
I	9	13,47 \pm 10,98 (4,3 – 31,5)
II	3	22,67 \pm 17,39 (2,9 – 35,6)
III	1	32,0
V	28	14,0 \pm 10,95 (2,4 – 38,1)
IX	2	7,5 \pm 4,5 (4,3 – 10,7)
Atp 1	12	17,2 \pm 12,2 (2,0 – 33,3)
Atp 2	14	22,45 \pm 12,2 (2,0 – 37,1)
Atp 3	4	5,42 \pm 3,16 (2,4 – 8,3)
Atp 4	6	10,88 \pm 10,2 (3,2 – 30,4)
Atp 5	3	8,9 \pm 4,3 (4,3 – 12,9)
Atp 6	1	4,9
Atp 7	5	11,92 \pm 7,67 (6,4 – 25,4)
Atp 8	3	15,67 \pm 8,95 (9,3 – 25,9)
Atp 9	2	9,7 \pm 0,14 (9,6 – 9,8)
Atp 10	1	10,2
Atp 11	2	29,55 \pm 10,67 (22,0 – 37,1)
Atp 12	3	31,97 \pm 7,94 (23,0 – 38,1)
Atp 13	2	25,64 \pm 0,35 (25,4 – 25,9)

Legenda: Atp = atípico; N = número amostral; (mín - máx) = valores mínimo e máximo.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela18, temos que os haplótipos Atp12, Atp11, Atp13 e II foram aqueles que apresentaram as maiores relações com altos níveis médios de Hb F (31,97%, 29,55%, 25,65% e 22,67%, respectivamente). Em contrapartida, os haplótipos Atp6, Atp3, IX e Atp5 estiveram mais relacionados com concentrações baixas dessa hemoglobina (4,9%, 5,42%, 7,5% e 8,9%, respectivamente).

A Tabela 19 mostra a relação existente entre os haplótipos β -globina encontrados e a presença de mutações para a PHHF e para a $\delta\beta$ -Talassemia e do sítio polimórfico *XmnI*. Dos 18 alelos diferentes encontrados para os haplótipos β -globina, apenas o Atp3 não estava relacionado com os outros polimorfismos analisados. Dentre esses diferentes alelos, os que apresentaram maiores níveis de Hb F foram o III, Atp12, Atp13, Atp8 e Atp 11 (32,0%, 38,1%, 25,9%, 25,9%, e 29,55%, respectivamente). Os alelos que apresentaram relação com menores níveis de Hb F foram IX, Atp6, Atp9, Atp7 (4,3%, 4,9%, 9,7% e 9,8%, respectivamente).

Tabela 19. Relação entre os haplótipos β -globina e os outros polimorfismos investigados nas amostras analisadas.

Haplótipos β -globina	PHHF	$\delta\beta$ -Talassemia	Polimorfismo <i>XmnI</i>	N	% Hb F
I	2	1	1	4	16,12 \pm 11,58
II	1	-	2	3	22,67 \pm 17,39
III	-	-	1	1	32,0
V	5	1	9	15	16,65 \pm 11,6
IX	1	-	-	1	4,3
Atp 1	5	-	8	13	18,39 \pm 11,52
Atp 2	7	-	7	14	23,24 \pm 12,35
Atp 3	-	-	-	-	-
Atp 4	1	-	2	3	17,53 \pm 11,14
Atp 5	-	-	1	1	12,9
Atp 6	-	-	1	1	4,9
Atp 7	1	1	-	2	9,8 \pm 0,28
Atp 8	1	-	-	1	25,9
Atp 9	-	2	-	2	9,7 \pm 0,14
Atp 10	-	1	-	1	10,2
Atp 11	2	-	1	3	29,55 \pm 10,68
Atp 12	1	-	-	1	38,1
Atp 13	1	-	-	1	25,9

Legenda: Atp = atípico; N = número amostral.

Discussão

5 Discussão

No grupo avaliado, as amostras com níveis de Hb F abaixo de 15% apresentaram maior frequência dos polimorfismos $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola, *XmnI* e haplótipos da β -globina. Em contrapartida, a frequência dos polimorfismos avaliados em amostras com concentrações de Hb F acima de 15% foi menor, caracterizando um grupo no qual houve predominância de mutações de PHHF. A partir desses achados é possível sugerir que determinadas concentrações de Hb F podem estar relacionadas com diferentes mutações que influenciam os níveis dessa hemoglobina.

Nossos resultados mostraram que as mutações de $\delta\beta$ -Talassemia foram pouco presentes no grupo amostral avaliado. Nesse estudo, os heterozigotos para a $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola apresentaram níveis de Hb F que se encontram dentro da faixa de variação esperada para tal mutação, corroborando os dados da literatura (HUISMAN et al., 1996). A mutação de origem Siciliana não foi verificada nas amostras analisadas. Embora os relatos da literatura indiquem que ambas as mutações estão relacionadas ao aumento de Hb F, tais alterações não caracterizam o aumento dessa hemoglobina nas amostras analisadas, fato que requer a avaliação de outros polimorfismos relacionados aos elevados níveis de Hb F na vida adulta. Entretanto, não se pode descartar o fato de que o número reduzido de amostras analisadas possa ter influenciado a baixa frequência dessas mutações. A presença da mutação de origem espanhola, ainda que pouco frequente, reforça a influência de grupos étnicos mediterrâneos na formação da população avaliada nesse trabalho. Para confirmar tal hipótese, destacamos a necessidade da avaliação de outros marcadores genéticos de ancestralidade de melhor caracterização para os referidos grupos populacionais.

Craig et al. (1994) encontraram frequência de 56,5% para a mutação $\delta\beta$ -Talassemia Siciliana, na investigação de possíveis mutações relacionadas ao aumento de Hb F em indivíduos de origem italiana, grega e inglesa, diferindo dos resultados encontrados nesse trabalho. Andrade (2002) encontrou, na região de Campinas-SP, a presença de heterozigotos para a mutação de origem siciliana, mas não verificou a presença da mutação espanhola. A comparação dos nossos achados com os relatos de Andrade (2002) revelam um cenário distinto em relação às mutações de $\delta\beta$ -Talassemia na população do estado de São Paulo, que recebeu muitos imigrantes de origem mediterrânea. Em nosso grupo de estudo foi verificada apenas a mutação de etnia espanhola, ao passo que para indivíduos da região de Campinas foi observada somente a mutação de origem siciliana. Essa diferença pode indicar um processo

distinto de fluxo migratório ocorrido em nosso estado, refletindo em características desiguais de ambas as populações em relação às mutações herdadas.

De maneira geral, quando comparamos a frequência das mutações deletionais de PHHF (Apêndice C) e $\delta\beta$ -Talassemia investigadas no grupo de amostras analisado nesse trabalho, torna-se possível inferir que as mutações PHHF-1 (Black) e PHHF-2 (Ghana) estão mais relacionadas ao aumento nos níveis de Hb F. Além disso, a presença dessas mutações reforça o processo de miscigenação ocorrido na formação da população brasileira, com influência de diferentes grupos étnicos africanos.

Em relação à presença do polimorfismo *XmnI*, nossos achados revelaram frequência de 33,3%, com níveis médios de Hb F de 15,48% (variando de 2,0% a 33,3% do total de hemoglobinas) em indivíduos saudáveis. Sampietro et al. (1992) verificaram frequência de 14% em indivíduos saudáveis de origem caucasóide, e os níveis de Hb F relacionados à presença desse sítio polimórfico foram menores que 1,1%. Em populações japonesas e coreanas, a frequência desse polimorfismo foi de 16% e 15%, respectivamente (SHIMIZU et al., 1992).

Relatos da literatura mostram a influência desse sítio polimórfico em indivíduos com alterações de hemoglobinas. Para portadores de talassemia beta maior ou intermediária de origem iraniana, Karimi et al. (2002) verificaram a frequência do polimorfismo *XmnI* variando de 39% a 41%, diferindo dos achados de Neishabury et al. (2010), que encontraram frequência de 70,5% e 88,1%, respectivamente. Para indivíduos beta talassêmicos de origem indiana, Nadkarni et al. (2001) revelaram que a frequência desse sítio polimórfico foi de 25%. Relatos de Gibney et al. (2008) mostraram que para beta talassêmicos heterozigotos orientais a frequência do polimorfismo *XmnI* foi de 14%.

El-Hazmi (1989) investigou a frequência do polimorfismo *XmnI* em indivíduos saudáveis, heterozigotos para a Hb S e portadores de anemia falciforme nas regiões oriental e sudoeste da Arábia Saudita. A frequência desse sítio polimórfico foi maior na região oriental em relação à região sudoeste para todos os indivíduos avaliados. Para as amostras sem alterações de hemoglobinas, a frequência verificada foi de 10% na região oriental e de 9,6% na região sudoeste; para os heterozigotos a frequência observada foi de 62,5% para a primeira região e de 9,5% para a segunda; nos portadores de anemia falciforme, essa frequência foi de 93,2% e 3,3% para as regiões oriental e sudoeste, respectivamente. Esses achados revelaram que a frequência do polimorfismo *XmnI* nos indivíduos normais dessa região foram menores em relação à frequência verificada em nosso grupo amostral, fato que pode refletir uma característica intrínseca da população avaliada no presente trabalho.

Em nosso grupo de estudo, esse sítio polimórfico esteve mais presente em indivíduos cujos níveis de Hb F estavam abaixo de 15% do total de hemoglobinas. Relatos da literatura associam a presença desse polimorfismo com concentrações de Hb F variando de 2,9% a 5,1% (HUISMAN et al., 1996) e de 2,0% a 20,0% (STAMATOYANNOPOULOS et al., 1987) em indivíduos sem alterações de hemoglobinas. Nossos achados revelaram concentrações discrepantes de Hb F na presença do sítio polimórfico *XmnI*, indicando que esse polimorfismo pode estar relacionado a níveis mais elevados de Hb F em indivíduos saudáveis do que o relatado na literatura. No entanto, para quatro das 20 amostras que apresentaram esse sítio polimórfico, os níveis de Hb F foram explicados pela presença de outras mutações, dentre elas a P_HH_F e a $\delta\beta$ -Talassemia, de modo que a presença do polimorfismo *XmnI* não foi determinante para influenciar o aumento nos níveis de Hb F em tais amostras.

De maneira geral, os achados de nosso grupo de pesquisa em busca dos fatores genéticos envolvidos na regulação dos genes da γ -globina, em indivíduos adultos sem queixas de anemia da região Noroeste do estado de São Paulo, mostraram que os níveis elevados de Hb F são influenciados pela presença de mutações para a P_HH_F e do polimorfismo *XmnI*, evidenciando que ambas as alterações genéticas caracterizam a base molecular da população avaliada.

Os haplótipos β -globina têm sido bastante utilizados para obtenção de informações sobre as relações genéticas e evolutivas nas diferentes populações (MAGAÑA et al., 2010). Encontramos 27 padrões distintos de combinação genotípica. Apenas três dos 27 padrões encontrados não apresentaram haplótipos atípicos. O padrão Atp1/Atp2 foi o haplótipo mais frequente no grupo de amostras avaliado. Nossos achados em relação aos padrões de combinação de alelos foram os haplótipos I, II, III, V e IX, além de 13 alelos atípicos (Atp1 a Atp13). Dentre esses alelos atípicos, o Atp4 foi verificado por Bezerra (2007) em um indivíduo portador da interação Hb S/Beta-talassemia, proveniente do estado de Pernambuco. Esse indivíduo era portador da mutação de beta talassemia IVS-I-2, fenótipo β^0 , associado com quadro clínico grave (HUISMAN et al., 1996) e apresentava 15% de Hb F. Belini-Júnior (2010) encontrou dois dos alelos atípicos observados neste estudo (Atp1 e Atp3), em indivíduos portadores da interação Hb S/Beta-talassemia, provenientes do estado de São Paulo. O primeiro haplótipo atípico foi observado em dois indivíduos que apresentaram as mutações de beta talassemia IVS-I-6, fenótipo β^+ , associado com quadro clínico brando, e IVS-I-110, fenótipo β^+ , de clínica grave, cujos valores médios de Hb F verificados foram de

9,6%. O segundo haplótipo atípico foi verificado em um indivíduo portador da mutação IVS-I-6, com ausência de Hb F.

Em relação à frequência alélica dos haplótipos β -globina, Orkin et al. (1982) mostraram que a frequência individual de cada alelo variou de 1% a 47%, em indivíduos de origem mediterrânea portadores de beta talassemia, sendo o mais frequente o haplótipo I, seguido por II e V. Nossos achados mostraram que, para as amostras avaliadas, o haplótipo mais frequente foi o V, seguido pelos haplótipos atípicos Atp2 e Atp1. Com base nos polimorfismos avaliados, esses três haplótipos foram os que apresentaram maior relação com a presença de mutações para a PHHF e do polimorfismo *XmnI*. Labie et al. (1985) verificaram, em indivíduos beta talassêmicos da Algéria e Sicília, que os haplótipos III e IX estavam fortemente associados à presença do sítio polimórfico *XmnI*, enquanto que os haplótipos I, II e V não apresentaram tal relação, diferindo dos nossos achados em indivíduos saudáveis.

A frequência elevada do haplótipo V nas nossas amostras em relação aos relatos de Orkin et al. (1982) e a alta frequência de haplótipos atípicos podem refletir um intenso grau de miscigenação na população avaliada, sugerindo uma característica multiétnica para a população brasileira, com necessidade de avaliação de marcadores genéticos populacionais para corroborar tal hipótese.

Neste trabalho foram avaliados alguns dos polimorfismos presentes no *cluster* da β -globina conhecidos por influenciar a expressão dos genes γ e, conseqüentemente, os níveis de Hb F, dentre eles mutações deletionais para a PHHF, mutações para a $\delta\beta$ -Talassemia, polimorfismo *XmnI* e o padrão de combinação dos haplótipos da β -globina. No entanto, esses polimorfismos não conseguiram explicar, em sua totalidade, os níveis elevados de Hb F em indivíduos adultos, saudáveis e sem queixas de anemia, que foram avaliados nesse estudo, visto que esses polimorfismos foram verificados em 58,33% das amostras analisadas. Dessa forma, nossos achados reforçam os relatos da literatura em relação à influência de outros componentes genéticos presentes no *cluster* da β -globina como, por exemplo, a região dos genes dos receptores olfatórios, e de QTLs distribuídos pelo genoma, dentre eles SNPs na região 6q23, na região 2q16, na região Xp22.2 e na região 8q, sugerindo que outras regiões polimórficas estão envolvidas na regulação dos genes γ -globina.

Além desses componentes genéticos, os microRNAs (miRNAs) parecem estar relacionados ao processo de troca de expressão que ocorre entre a Hb F e a Hb A, processo importante para o desenvolvimento clínico de portadores de anemia falciforme e talassemia beta. Estudos realizados por Noh et al. (2009) mostraram a expressão diferenciada de

miRNAs em amostras de cordão umbilical e de indivíduos adultos, sugerindo que a expressão de determinados miRNAs ocorrem em associação com a troca de expressão de genes durante a transição do período fetal para adulto em humanos. Em relação à regulação dos genes da γ -globina, Bianchi et al. (2009) verificaram que o miR-210 atua na indução da produção de Hb F, sugerindo o envolvimento desse miRNA na regulação dos genes γ -globina durante o processo de diferenciação da linhagem eritróide.

De maneira geral, o entendimento e identificação dos fatores genéticos que influenciam a expressão dos genes da γ -globina podem auxiliar na descoberta e desenvolvimento de estratégias terapêuticas para promover o aumento da Hb F em indivíduos portadores de alterações de hemoglobinas, como a anemia falciforme e talassemia beta, reduzindo as complicações clínicas e proporcionando melhora nas condições de vida desses pacientes.

Conclusões

6 Conclusões

- Foram encontradas três amostras heterozigotas para a mutação $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola, mas o mesmo não foi verificado para a $\delta\beta$ -Talassemia Siciliana. A presença da mutação de origem espanhola, ainda que pouco frequente, reforça a influência de grupos étnicos mediterrâneos na formação da população avaliada nesse trabalho.
- Em relação à presença do polimorfismo *XmnI*, nossos achados revelaram frequência acima da média encontrada na literatura para a população saudável. Esse sítio polimórfico esteve mais presente em indivíduos cujos níveis de Hb F estavam abaixo de 15% do total de hemoglobinas. Para quatro amostras que apresentaram esse sítio polimórfico, os níveis de Hb F foram explicados pela presença de outras mutações, de modo que a presença do polimorfismo *XmnI* não foi determinante para influenciar o aumento nos níveis de Hb F em tais amostras.
- Em relação aos haplótipos β -globina, verificamos a presença de muitos alelos atípicos para a população analisada. Alguns dos haplótipos atípicos apresentaram associação com mutações para a PHHF, $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola e o polimorfismo *XmnI*, além de níveis de Hb F acima dos valores de normalidade para indivíduos adultos.
- No grupo de indivíduos avaliado, a mutação $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola, o polimorfismo *XmnI* e a maioria dos padrões de combinação dos haplótipos β -globina encontrados foram verificados com maior frequência em amostras que apresentavam níveis de Hb F inferiores a 15%. Em contrapartida, as mutações de PHHF-1 e PHHF-2 foram mais frequentes em amostras de indivíduos com concentrações de Hb F acima de 15% do total de hemoglobinas.

Concluimos que os polimorfismos avaliados, com exceção da mutação $\delta\beta$ -Talassemia Siciliana, estão relacionados com os aumentos nos níveis de Hb F em indivíduos adultos e saudáveis que fizeram parte desse estudo. No entanto, esses fatores genéticos não conseguiram explicar, em sua totalidade, o aumento da expressão dos genes da γ -globina, sugerindo que outras regiões polimórficas possam atuar na regulação dos genes γ e influenciar as concentrações de Hb F na vida adulta.

Referências

7 Referências

ANDRADE, T.G. **Análise molecular de deficiências gênicas associadas à Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal e Delta Beta Talassemias**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 75p, 2002.

BALLAS, S.K.; TALACKI, C.A.; ADACHI, K.; et al. The *XmnI* site (-158, C→T) 5' to the G gamma gene: correlation with the Senegalese haplotype and G gamma globin expression. **Hemoglobin**, v. 15, p. 393-405, 1991.

BEHRINGER, R. R.; HAMMER, R.E.; BRINSTER, R.L.; et al. Two 3' sequences direct adult erythroid-specific expression of human β globin genes in transgenic mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 84, p. 7056-7060, 1987.

BELINI-JÚNIOR, E. **Estresse oxidativo em doentes falciforme: influência dos haplótipos e uso de medicação específica**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, SP, 167p, 2010.

BELINI-JÚNIOR, E.; CANÇADO, R. D.; BONINI-DOMINGOS, C. R. The *XmnI* polymorphic site 5' to the γ gene in a Brazilian patient with sickle cell anaemia – fetal haemoglobin concentration, haematology and clinical features. **Arch Med Sci**, v. 6, n. 5, p. 822-825, 2010.

BEZERRA, M.A.C. **Aspectos Clínicos, Bioquímicos e Moleculares das Síndromes Talassêmicas em Populações do Estado de Pernambuco**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 141p, 2007.

BIANCHI, N.; ZUCCATO, C.; LAMPRONTI, I.; et al. Expression of miR-210 during erythroid differentiation and induction of γ -globin gene expression. **BMB Reports**, v. 42, n. 8, p. 493-499, 2009.

BONINI-DOMINGOS, C.R. **Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemia**. Editora HN, 121 p, 2006.

_____. Thalassaemia screening in Brazil – Results for 20 years. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 288-289, 2004.

CAO, A.; MOI, P. Genetic modifying factors in β -thalassaemia. **Clin Chem Lab Med**, v. 38, p. 123–132, 2000.

CHAKALOVA, L.; OSBORNE, C.S.; DAI, Y.F.; et al. The Corfu $\delta\beta$ -thalassemia deletion disrupts γ -globin gene silencing and reveals post-transcriptional regulation of Hb F expression. **Blood**, v. 105, p. 2154-2160, 2005.

CHEN, L.; EASTEAL, S.; BOARD, P.G. Evolution of the β -globin haplotypes in human populations. **Mol Biol Evol**, v. 7, n. 3, p. 423-437, 1990.

CHEN, Z.; LUO, H.Y.; STEINBERG, M.H.; et al. BCL11A represses HBG transcription in K562 cells. **Blood Cells Mol Dis**, v. 42, p. 144-149, 2009.

COLLINS, F.S.; STOECKERT, C.J.Jr.; SERJEANT, C.R.; et al. Gamma beta⁺ hereditary persistence of fetal hemoglobin: cosmid cloning and identification of a specific mutation 5' to the ^Agamma gene. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 81, p. 4894-4898, 1984.

CRAIG, J.E.; BARNETSON, R.A.; PRIOR, J.; et al. Rapid Detection of Deletions Causing $\delta\beta$ Thalassemia and Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin by Enzymatic Amplification. **Blood**, v. 83, p. 1673-1682, 1994.

CRAIG, J.E.; ROCHETTE, J.; FISHER, C.A.; et al. Dissecting the loci controlling fetal haemoglobin production on chromosomes 11p and 6q by the regressive approach. **Nat Genet**, v. 12, p. 58-64, 1996.

CRAIG, J.E.; ROCHETTE, J.; SAMPIETRO, M.; et al. Genetic heterogeneity in heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Blood**, v. 90, p. 428-454, 1997.

DILLON, N.; TRIMBORN, T.; STROUBOULIS, J.; et al. The effect of distance on long-range chromatin interactions. **Mol Cell**, v. 1, p. 131-139, 1997.

DOVER, G.J.; SMITH, K.D.; CHANG, Y.C.; et al. Fetal Hemoglobin Levels in Sickle Cell Disease and Normal Individuals Are Partially Controlled by an X-Linked Gene Located at Xp22.2. **Blood**, v. 80, p. 816-824, 1992.

EFREMOV, D.G.; DIMOVSKI, A.J.; BAYSAL, E.; et al. Possible Factors Influencing the Haemoglobin and Fetal Haemoglobin Levels in Patients with β Talassaemia due to a Homozygosity for the IVS-I-6 (T→C) Mutation. **Br J Haematol**, v. 86, p. 824-830, 1994.

EFREMOV, G.D.; GJORGOVSKI, I.; STOJANOVSKI, N.; et al. One haplotype is associated with the Swiss type of hereditary persistence of fetal hemoglobin in the Yugoslavian population. **Hum Genet**, v. 77, p. 132, 1987.

EL-HAZMI, M.A.F. Xmn I polymorphism in the Gamma-globin gene region among Saudis. **Hum Hered**, v. 39, p. 790-792, 1989.

EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. São Carlos, 2007.

ENVER, T.; RAICH, N.; EBENS, A.J.; et al. Developmental regulation of human fetal-to-adult globin gene switching in transgenic mice. **Nature (London)**, v. 344, p. 309-313, 1990.

FISHER, C.A.; PREMAWARDHENA, A.; SILVA, S.; et al. The Molecular Basis for the Thalassaemia in Sri Lanka. **Br J Haematol**, v. 121, p. 662-671, 2003.

FORGET, B.G. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Ann N Y Acad Sci**, v. 850, p. 38-44, 1998.

FORRESTER, W. C.; THOMPSON, C.; ELDER, J.T.; et al. A developmentally stable human β -globin gene cluster. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 83, p. 1359-1363, 1986.

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

GALARNEAU, G.; PALMER, C. D.; SANKARAN, V. G.; et al. Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. **Nat Genet**, v. 42, n. 12, p. 1049-1051, 2010.

GARNER, C.; MITCHELL, J.; HATZIS, T.; et al. Haplotype Mapping of a Major Quantitative-Trait Locus for Fetal Hemoglobin Production, on Chromosome 6q23. **Am J Hum Genet**, v. 62, p. 1468-1474, 1998.

GARNER, C.; TATU, T. REITTIE, J.E.; et al. Genetic influences on F cells and other hematologic variables: a twin heritability study. **Blood**, v. 95, p. 342-346, 2000a.

GARNER, C.; TATU, T.; GAME, L.; et al. A candidate gene study of F cell levels in sibling pairs using a joint linkage and association analysis. **GeneScreen**, v. 1, p. 9-14, 2000b.

GARNER, C.P.; TATU, T.; BEST, S.; et al. Evidence of Genetic Interaction between the β -Globin Complex and Chromosome 8q in the Expression of Fetal Hemoglobin. **Am J Hum Genet**, v. 70, p. 793–799, 2002.

GIBNEY, G.T.; PANHUYSSEN, C.I.M.; SO, J.C.C.; et al. Variation and heritability of Hb F and F-cells among β -thalassemia heterozygotes in Hong Kong. **Am J Hematol**, v. 83, p. 458-464, 2008.

GROSVELD, F.; DILLON, N.; HIGGS, D. The regulation of human globin gene expression. **Baillieres Clin Hematol**, v. 6, p. 31-55, 1993.

HANSCOMBE, O.; WHYATT, D.; FRASER, P.; et al. Importance of globin gene order for correct developmental expression. **Genes Dev**, v. 5, p. 1387-1394, 1991.

HONIG, G.R.; ADAMS III, J.G. **Human Hemoglobin Genetics**. New York:Springer-Verlag Wien, 1986. 236 p.

HUISMAN, H.J. et al. HbVar: **A database of Human Hemoglobin variants and Thalassemias. Summaries of mutation categories**. Pennsylvania University USA and McMaster University in Canada, 1996. Disponível em <http://globin.cse.psu.edu/>>. Acesso em 20 de Maio de 2010.

HUISMAN, T.H.J.; MILLER, A.; SCHROEDER, W.A. A gamma type of hereditary persistence of fetal hemoglobin with beta chain production in cis. **Am J Hum Genet**, v. 27, p. 765-777, 1975.

JACKSON, J. D.; PETRYKOWSKA, H.; PHILIPSEN, S.; et al. Role of DNA sequences outside the cores of DNase hypersensitive sites (HSs) in functions of the β -globin locus control region. **J Biol Chem**, v. 271, p. 11871-11878, 1996.

KARIMI, M.; et al. Beta thalassemia intermedia from southern Iran: IVSII.1 (G:A) is the prevalent thalassemia intermedia allele. **Hemoglobin**, v. 26, p. 147-154, 2002.

KAZAZIAN, H.H.; ORKIN, S.H.; ANTONARAKIS, S.E.; et al. Molecular Characterization of Seven β -Thalassemia Mutations in Asian Indians. **EMBO J**, v. 3, n. 3, p. 593-596, 1984.

KOTEVA, N.; RAMASAWMY, R.; LU, C.Y.; et al. Spectrum of β thalassemia mutations and their linkage to β -globin gene haplotypes in the Indo-Mauritians. **Am J Hematol**, v. 63, p.11-15, 2000.

KULOZIK, A.E.; BAIL, S.; KAR, B.C.; et al. Sickle Cell- β^+ Thalassaemia in Orissa State, India. **Br J Haematol**, v. 77, p. 215-220, 1991.

LABIE, D.; DUNDA-BELKHODJA, O.; ROUABHI, F.; et al. The -158 site 5' to the $G\gamma$ gene and $G\gamma$ expression. **Blood**, v. 66, n. 6, p. 1463-1465, 1985.

LANGDON, S. D.; KAUFMAN, R. E. Gamma-globin gene promoter elements required for interaction with globin enhancers. **Blood**, v. 91, p. 309-318, 1998.

LETTRE, G.; SANKARAN, V.G.; BEZERRA, M.A.; et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and γ -globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. **PNAS**, v. 105, p. 11869-11874, 2008.

LONG, J.C.; CHAKRAVARTI, A.; BOEHM, C.D.; et al. Phylogeny of human beta-globin haplotypes and its implications for recent human evolution. **Am J Phys Anthropol**, v. 81, n. 1, p. 113-130, 1990.

MAGAÑA, M.T.; IBARRA, B.; LUÉVANO, K.E. Analysis of linkage disequilibrium between the 5' and 3' haplotypes of the β -globin gene cluster in Mexican afromestizos. **Blood Cells Mol Dis**, v. 44, p. 89-94, 2010.

MAKHOUL, N.J.; WELLS, R.S.; KASPAR, H.; et al. Genetic heterogeneity of beta thalassaemia in Lebanon reflects historic and recent population migration. **Ann Hum Genet**, v. 65, p. 55-66, 2005.

MANCA, L.; MASALA, B. Disorders of the synthesis of Human Fetal Hemoglobin. **Life**, v. 60, p. 94-111, 2008.

MARTINEZ, G.; et al. A case of hereditary persistence of foetal haemoglobin caused by a gene not linked to the β -globin cluster. **Hum Genet**, v. 82, p. 335-337, 1989.

MENZEL, S.; GARNER, C.; GUT, I.; et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. **Nat Genet**, v. 39, n. 10, p. 1197-1199, 2007.

MIRANDA, S.R.P.; FONSECA, S.F.; FIGUEIREDO, M.S.; et al. Hb Köln [$\alpha^2\beta^2$ 298(FG5) Val \rightarrow Met] identified by DNA analysis in a Brazilian family. **Br J Genet**, v. 20, p. 745-748, 1997.

MIYOSHI, K.; KANETO, Y.; KAWAI, H.; et al. X-linked dominant control of F-cells in normal adult life: characterization of the Swiss type as hereditary persistence of fetal hemoglobin regulated dominantly by gene(s) on X chromosome. **Blood**, v. 72, p. 1854-1860, 1988.

NADKARNI, A.; GORAKSHAKAR, A.C.; LU, C.Y.; et al. Molecular pathogenesis and clinical variability of beta-thalassemia syndromes among Indians. **Am J Hematol**, v. 68, p. 75-80, 2001.

NEISHABURY, M.; AZARKEIVAN, A.; NAJMABADI, H. Frequency of positive XmnI Ggamma polymorphism and coinheritance of common alpha thalassemia mutations do not show statistically significant difference between thalassemia major and intermedia cases with homozygous IVSII-1 mutations. **Blood Cells Mol Dis**, v. 44, p. 95-99, 2010.

NEMATI, H., RAHIMI, Z.; BAHRAMI, G. The XmnI polymorphic site 5' to the G γ gene and its correlation to the G γ :A γ ratio, age at the first blood transfusion and clinical features in β -Thalassemia patients from Western Iran. **Mol Biol Rep**, v. 37, n. 1, p. 159-164, 2009.

NGUYEN, T.K.T.; JOLY, P.; BARDEL, C.; et al. The XmnI G γ polymorphism influences hemoglobin F synthesis contrary to BCL11A and HBS1L-MYB SNPs in a cohort of 57 β -thalassemia intermedia patients. **Blood Cells Mol Dis**, v. 45, n. 2, p. 124-127, 2010.

NOH, S.J.; MILLER, S.H.; LEE, T.; et al. Let-7 microRNA are developmentally regulated in circulating human erythroid cells. **J Transl Med**, v. 7:98, 2009.

NUSSBAUM, R.L.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F. **THOMPSON & THOMPSON**, Genética Médica, 7a ed., Editora Guanabara, cap. 11, p. 243-264, 2008.

OLAVE, I.A.; DONEANU, C.; FANG, X.; et al. Purification and Identification of Proteins That Bind to the Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin -198 Mutation in the γ -Globin Gene Promoter. **J Biol Chem**, v. 282, n. 2, p. 853-862, 2007.

OLD, J.; TRAEGER-SYNIDINOS, J.; GALANELLO, R.; et al. **Prevention of Thalassaemias and other Haemoglobin Disorders**. Thalassaemia International Federation Publications (3), 2005, v. 2, cap. 5.

ORKIN, S.H.; KAZAZIAN, H.H.; ANTONARAKIS, S.E.; et al. Linkage of β -thalassemia mutations and β -globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human β -globin gene cluster. **Nature**, v. 296, p. 627-631, 1982.

PACE, B.S.; ZEIN, S. Understanding Mechanisms of γ -Globin Gene Regulation to Develop Strategies for Pharmacological Fetal Hemoglobin Induction. **Dev Dyn**, v. 235, p. 1727-1737, 2006.

PANYASAI, S.; FUCHAROEN, S.; SURAPOT, S.; et al. Molecular basis and hematologic characterization of $\delta\beta$ -thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin in Thailand. **Haematologica**. v. 89, p. 777-781, 2004.

PERI, K.G.; GAGNON, J.; GAGNON, C.; et al. Association of 158 (C \rightarrow T) (*XmnI*) DNA polymorphism in G [γ]-globin promoter with delayed switchover from fetal to adult hemoglobin synthesis. **Pediatr Res**, v. 41, p. 214-217, 1997.

PERUTZ, M.F. Molecular anatomy and physiology of hemoglobin. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, and Nagel RL eds. **Disorders of Haemoglobin**. Cambridge University Press, Cambridge, pp 174-196, 2001.

ROMANA, M.; KECLARD, L.; GUILLEMIN, G.; et al. Molecular characterization of β -thalassemia mutations in Guadalupe. **Am J Hematol**, v. 53, p. 228-233, 1996.

RUTLAND, P.C.; PEMBREY, M.E.; DAVIES, T. The estimation of fetal haemoglobin in healthy adults by radioimmunoassay. **Br J Haematol**, v. 53, p. 673-682, 1983.

SAMPIETRO, M., THEIN, S.L., CONTRERAS, M.; et al. Variation of Hb F and F-cell number with the G^{γ} *XmnI* (C-T) polymorphism in normal individuals. **Blood**, v. 79, n. 3, p. 832-833, 1992.

SANKARAN, V.G.; MENNE, T.F.; XU, J.; et al. Human foetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. **Science**, v. 322, p. 1839-1842, 2008.

SCHRIER, S.L. Thalassemia: pathophysiology of red cell changes. **Ann Rev Med**, v. 45, p. 211-218, 1994.

SHEN, S.S.; SLIGHTOM, J.R.; SMITHIES, O. A history of the human fetal globin gene duplication. **Cell**, v. 26, p. 191-203, 1981.

SHIMIZU, K.; PARK, K.S.; ENOKI, Y. The *XmnI* site 5' to the G γ -globin gene polymorphism and its relationship to % Hb F and % G γ in normal Japanese and Korean adults. **Hum Hered**, v. 42, n. 2, p. 253-258, 1992.

SLIGHTON, J.L.; BLECHL, A.E.; SMITHIES, O. Human fetal $^G\gamma$ and $^A\gamma$ -globin genes: complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes. **Cell**, v. 21, p. 627-638, 1980.

SOLOVIEFF, N.; MILTON, J.N.; HARTLEY, S.W.; et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genome-wide association studies suggest a regulatory region in the 5' olfactory receptor gene cluster. **Blood**, v. 115, p. 1815-1822, 2010.

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

STAMATOYANNOPOULOS, G.; GROSVELD, F. Hemoglobin switching. In: Stamatoyannopoulos G; Majerus PW; Perlmutter RM; Varmus H, eds. **The molecular basis of blood disease**. Philadelphia:Saunders, 2001, v. 3.

STAMATOYANNOPOULOS, G.; NIENHUIS, A.; MAJERUS, X.; et al. **The molecular Basis of Blood diseases**. 2nd ed. Philadelphia:WB Saunders Company, 1994.

STAMATOYANNOPOULOS, G.; NIENHUIS, A.W. Hemoglobin Switching. In: Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Leder P, Majerus PW (eds): **The Molecular Basis of Blood Diseases**. Philadelphia, PA, Saunders, 67p, 1987.

STEINBERG, M. H. Genetic Etiologies for Phenotypic Diversity in Sickle Cell Anemia. **ScientificWorldJournal**, v. 9, p. 46-67, 2009.

STEINBERG, M.H.; FORGET, B.G.; HIGGS, D.R.; et al (eds). **Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management**. Cambridge University Press, Cambridge, pp 356-388, 2001.

SUTTON, M.; BOUHASSIRA, E.E.; NAGEL, R.L. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene *cluster* haplotypes. **Am J Hematol**, v. 32, p. 66-69, 1989.

THEIN, S.L. Genetic insights into the clinical diversity of β -thalassaemia. **Br J Haematol**, v. 124, p. 264-274, 2004.

_____. Genetic Modifiers of β -Thalassemia. **Haematologica**, v. 90, p. 649-660, 2005.

THEIN, S.L.; MENZEL, S. Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. **Br J Haematol**, v. 145, p. 455-467, 2009.

THEIN, S.L.; MENZEL, S.; LATHROP, M.; et al. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. **Hum Mol Genet**, v. 18, p. 216-223, 2009.

THEIN, S.L.; WEATHERALL, D.J. Hemoglobin Switching. In: **A non-deletion hereditary persistence of foetal hemoglobin (HPFH) determinant not linked to the beta-globin gene complex**. Alan R Liss Inc Press, New York, 1989. pp. 97–111.

UDA, M.; GALANELLO, R.; SANNA, S.; et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, p. 1620–1625, 2008.

VARAWALLA, N.Y.; FITCHES, A.C.; OLD, J.M. Analysis of β -globin haplotypes in Asian Indians: origin and spread of β -thalassemia on the Indian subcontinent. **Hum Genet**, v. 90, p. 443-449, 1992.

VENKATESAN, R.; SARKAR, R.; OLD, J.M. β -Thalassaemia Mutations and their Linkage to β -Haplotypes in Tamil Nadu in Southern India. **Clin Genet**, v. 42, p.251-256, 1992.

VIVES-CORRONS, J.L.I.; PUJADES, M.A.; MIGUEL, A.; et al. Screening of Spanish ($\delta\beta^0$) thalassemia by polimerase chain reaction (PCR). Combined Meeting of British Society for Haematology and British Society for Haemostasis and Thrombosis, Glasgow, 20-22 March 1991, Abstracts. **Br J Haematol**, v. 77 Suppl 1: 1-84, 1991.

WAHLBERG, K.; et al. The *HBS1L-MYB* intergenic interval associated with elevated HbF levels shows characteristics of a distal regulatory region in erythroid cells. **Blood**, v. 114, p. 1254-1262, 2009.

WAINSCOAT, J.S.; WORK, S.; SAMPIETRO, M.; et al. Feasibility of prenatal diagnosis of beta thalassaemia by DNA polymorphisms in an Italian population. **Br J Haematol**, v. 62, n. 3, p. 495–500, 1986.

WEATHERALL, D.J. Hemoglobinopathies Worldwide: Present and Future. **Curr Mol Med**, v. 8, p. 592-599, 2008.

WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J. **The Thalassemia Syndromes**. 4th ed. London:Blackwell Science, 2001b.

_____. **The Thalassemia Syndromes**. 3rd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1981.

_____. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bull World Health Organ**, v. 79, n. 8, p. 704-712, 2001a.

XU, J.; SANKARAN, V.G.; NI, M.; et al. Transcriptional silencing of γ -globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. **Genes Dev**, v. 24, p. 783-798, 2010.

XU, X.S.; HONG, X.; WANG, G. Induction of endogenous γ -globin gene expression with decoy oligonucleotide targeting Oct-1 transcription factor consensus sequence. **J Hematol Oncol**, v. 2, n. 15, p. 1-11, 2009.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. Edição Revista e Atualizada. Editora Ateneu. cap. 29, p. 279-287, 2004.

ZAHED, L.; QATANANI, M.; NABULSI, M.; et al. β -thalassemia mutations and haplotype analysis in Lebanon. **Hemoglobin**, v. 24, n. 4, p. 269-276, 2000.

ZAMARO, P.J.A. Análise quantitativa e molecular de hemoglobina fetal em doadores de sangue. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, n. 4, 2002.

Apêndices

8 Apêndices

8.1 **Apêndice A:** Artigo de revisão submetido à Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (ISSN: 1516-8484, Fator de Impacto: 0,3644, ano base 2009).

O que influencia a produção de Hb Fetal na idade adulta? (What influences the Hb Fetal production in adulthood?)

Gisele Cristine de Souza Carrocini^I, Paula Juliana Antoniazco Zamaro^I, Claudia Regina Bonini Domingos^{II}

^I Bióloga. Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), Universidade Estadual Paulista – UNESP/IBILCE – São José do Rio Preto-SP.

^{II} Bióloga. Coordenadora do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), Universidade Estadual Paulista – UNESP/IBILCE – São José do Rio Preto-SP.

Abstract

The human hemoglobin genes are located in α and β globin clusters, present in chromosomes 16 and 11, respectively. Different types of hemoglobin are synthesized according to the stages of development, and fetal hemoglobin ($\alpha_2 \gamma_2$) (Hb F) is the main hemoglobin in fetal period. After birth, there is a reduction in Hb F levels, until 1%, and adult hemoglobin, Hb A ($\alpha_2 \beta_2$), shows concentration above 96% of total hemoglobin. However, some genetic conditions, linked or not to the β -globin gene cluster, are associated with elevated Hb F levels in adult life. Among the conditions linked to the β -globin are the Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH), Delta-Beta Thalassemia ($\delta\beta$ -Thalassemia) and the *XmnI* polymorphism (-158 C > T). Other polymorphisms not related to β -globin gene cluster are known to influence γ -globin gene expression in adulthood. The most relevant polymorphism to the increase in the concentration of Hb F are the *HMIP locus* on chromosome 6, the *BCL11A locus* on chromosome 2, region Xp22.2 on the X chromosome and 8q region on chromosome 8. The understanding of genetic variants that contribute to the variation in Hb F levels can assist in the discovery of new therapeutic strategies and development of pharmaceutical agents to promote the increase of this hemoglobin, improving the clinical status of patients with beta-hemoglobinopathies.

Key-words: Hb F, HPFH, $\delta\beta$ -Thalassemia, *XmnI* polymorphism.

Resumo

Os genes da hemoglobina humana estão localizados em duas famílias gênicas, alfa (α) e beta (β), nos cromossomos 16 e 11, respectivamente. Diferentes tipos de hemoglobina são sintetizadas de acordo com os estágios do desenvolvimento, sendo a hemoglobina fetal ($\alpha_2 \gamma_2$) (Hb F) a principal hemoglobina no período fetal. Após o nascimento, há uma redução nos níveis dessa Hb mantendo-se em até 1%. No entanto, algumas condições genéticas, ligadas ou não à família β -globina, estão relacionadas com níveis elevados de Hb F na vida adulta. Dentre as condições ligadas à β -globina estão a Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF), a Delta-Beta Talassemia ($\delta\beta$ -Talassemia) e o polimorfismo *XmnI* (-158 C > T). Outros polimorfismos não ligados à família beta-globina são conhecidos por influenciar a expressão dos genes γ -globina na vida adulta, sendo os mais relevantes para o aumento nas concentrações de Hb F o locus *HMIP* no cromossomo 6, o locus *BCL11A* no cromossomo 2, a região Xp22.2 no cromossomo X e a região 8q no cromossomo 8. O entendimento das variantes genéticas que contribuem para a variação nos níveis de Hb F pode auxiliar na descoberta de novas estratégias terapêuticas e desenvolvimento de agentes farmacológicos para promover o aumento dessa hemoglobina, melhorando o quadro clínico de portadores de beta-hemoglobinopatias.

Palavras-chave: Hb F, PHHF, $\delta\beta$ -Talassemia, polimorfismo *XmnI*.

Organização dos genes globínicos

Os genes da hemoglobina humana estão localizados em duas famílias gênicas, denominadas α (alfa) e β (beta) globina. A família de genes α -globina está localizada no braço curto do cromossomo 16, e a cadeia polipeptídica formada totaliza 141 aminoácidos. É composta por três genes inativos, os pseudogenes ($\psi\zeta$, $\psi\alpha$ e $\psi\rho$), três genes funcionais (ζ , α_1 e α_2) e dois genes com funções não identificadas in vivo (μ e θ_1)¹. A família de genes β -globina está localizada no braço curto do cromossomo 11, cujos produtos de síntese apresentam 146 aminoácidos. Essa família é composta por um pseudogene ($\psi\beta$) e cinco genes funcionais, expressos durante as diferentes fases do desenvolvimento, na mesma ordem em que estão dispostos no segmento de DNA ($5' - \epsilon \gamma^G \gamma^A \delta \beta - 3'$)^{2,3}. A Figura 1 ilustra a localização e estrutura das famílias gênicas α e β -globina.

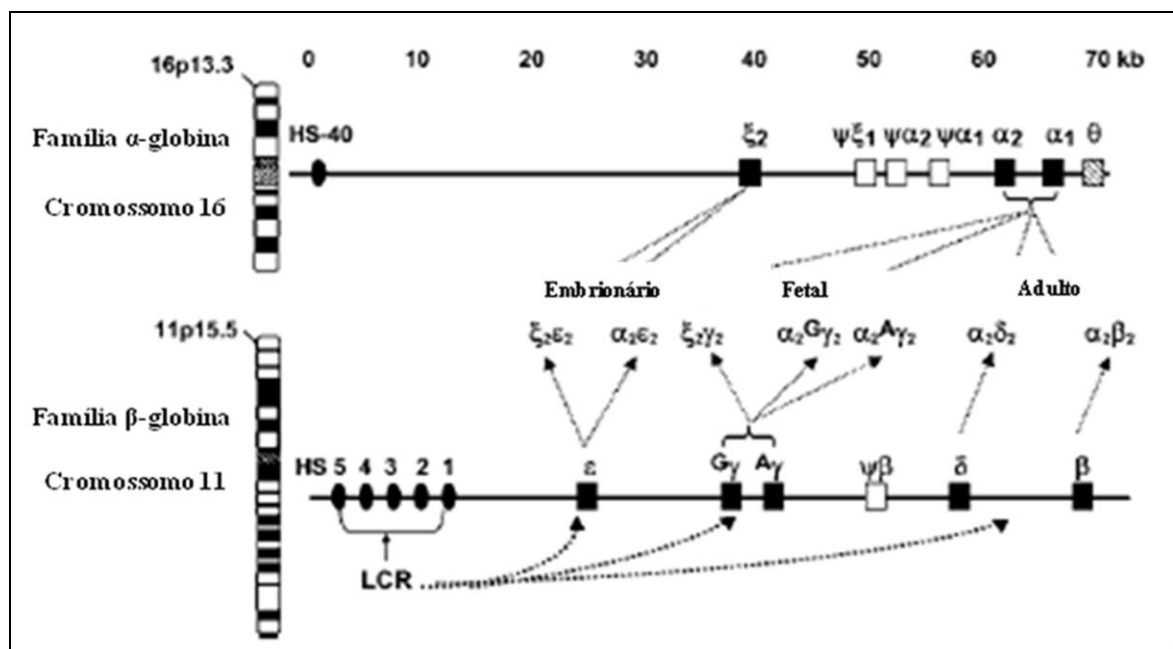


Figura 1: Localização das famílias α e β -globina e composição das moléculas de Hb formadas (Modificado de Manca & Masala, 2008)⁴.

Durante a ontogenia das cadeias globínicas, os eritrócitos expressam diferentes genes pertencentes às famílias α e β -globina e a mudança na expressão dos mesmos ocorre em dois estágios distintos do desenvolvimento: (1) do período embrionário para o fetal, no início da gestação, que envolve a mudança na expressão das globinas tipo alfa (ζ por α) e tipo beta (ϵ por γ); e (2) do período fetal para o adulto, envolvendo a mudança apenas nas globinas tipo beta (γ por β), ocorrendo, aproximadamente, seis meses após o nascimento⁵.

A Hemoglobina Fetal e os benefícios para indivíduos com alterações de hemoglobina

A hemoglobina Fetal (Hb F), formada por duas cadeias globínicas α e duas γ ($\alpha_2 \gamma_2$), é produzida em altos níveis durante o período fetal, devido à elevada expressão dos genes da γ -globina⁶.

Os genes γ -globina, cuja expressão é predominante no período fetal, são resultantes de uma duplicação *em tandem* de 5 kilobases (kb). Esses genes diferem em apenas um aminoácido, glicina (γ^G) ou alanina (γ^A), na posição 136 da cadeia polipeptídica. Ao nascimento, as cadeias γ^G são mais abundantes, enquanto que as cadeias γ^A predominam na vida adulta⁷.

Em indivíduos adultos, o gene da β -globina é predominantemente expresso e a hemoglobina adulta, Hb A ($\alpha_2 \beta_2$), consiste em aproximadamente 98% do total de hemoglobinas, enquanto os genes da γ -globina são pouco expressos e a Hb F consiste em menos de 1% do total⁸. A variação nas concentrações de Hb F é avaliada de maneira mais sensível pela identificação das células F, eritrócitos adultos que contêm quantidades mensuráveis dessa Hb. Os níveis de células F e Hb F variam consideravelmente em indivíduos adultos saudáveis e, geralmente, existe uma boa correlação entre os níveis dessas células e de Hb F^{9,10}.

Quando os genes da γ -globina estão altamente expressos, a presença de níveis aumentados de Hb F nos eritrócitos pode compensar os produtos defeituosos da β -globina e reduzir significativamente os sintomas de hemoglobinopatias como a anemia falciforme⁸. A concentração de Hb F e sua distribuição entre os eritrócitos são um dos principais moduladores genéticos da doença, visto que altos níveis dessa Hb diluem a quantidade de Hb S, inibindo ou retardando o seu processo de polimerização, o que resulta na diminuição de eventos deletérios¹¹. Na talassemia beta, o aumento induzido na produção de cadeias gama tem um efeito benéfico no quadro clínico de homocigotos para essa doença, não apenas por reduzir o desequilíbrio das cadeias do tipo α / não α , mas também por produzir um aumento na síntese de Hb total¹². Assim, a expressão aumentada dos genes da γ -globina tem relevância clínica no tratamento das doenças relacionadas à β -globina⁸.

Algumas condições genéticas são conhecidas por influenciar a expressão dos genes γ -globina na vida adulta. Dentre elas estão a Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF) e a Delta-Beta Talassemia ($\delta\beta$ -Talassemia)^{13,14}.

Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal

A PHHF é uma condição geralmente benigna, caracterizada pela não mudança na síntese de globina gama para beta, resultando na produção substancial de cadeias gama e, conseqüentemente, de Hb F ¹⁵. Tal condição pode ocorrer por mutações pontuais na região promotora dos genes γ -globina ou por deleções de parte da família β -globina ¹⁶. De acordo com a literatura, os níveis de Hb F para as PHHF delecionais são, na maioria dos casos, mais elevados em relação às mutações não-delecionais.

As mutações de PHHF estão associadas a diferentes grupos étnicos. Indivíduos que apresentam mutações para a PHHF exibem eritrócitos normais ¹⁷. Em estudos realizados por nosso grupo de pesquisa em busca de mutações relacionadas ao aumento de Hb F na vida adulta, em indivíduos saudáveis e sem queixa de anemia, verificamos a presença de 26,7% de indivíduos heterozigotos para a forma delecional de PHHF, dentre elas a PHHF-1 (Black) e a PHHF-2 (Ghana), sendo essa última a mutação mais frequente. As duas mutações avaliadas foram verificadas em indivíduos que apresentavam níveis de Hb F acima de 15% do total de hemoglobinas (dados não publicados). Em relação à morfologia eritrocitária, verificamos a presença de alterações discretas, o que reflete um cenário diferente em relação aos achados da literatura.

A Tabela 1 apresenta as diferentes concentrações de Hb F para as mutações pontuais e delecionais de PHHF, bem como os grupos étnicos que estão associados com cada uma das mutações.

Tabela 1: Mutações associadas com aumento de Hb Fetal, grupos étnicos e valores de Hb F.

Tipo de mutação	Mutação	% de Hb F*
Mutações Pontuais	- 110 (A → C) γ^G (Suíça)	0,6% - 0,8%
	- 114 (C → G) γ^G (Australiana)	8,6%
	- 114 (C → T) γ^G (Japonesa)	11,0% - 14,0%
	- 175 (T → C) γ^G	22,1%
	- 202 (C → G) γ^G	18,0% - 23,5%
	- 114 (C → T) γ^A (Geórgia)	4,7% - 4,8%
	- 117 (G → A) γ^A (Negra-Grega)	10,9% - 15,9%
	- 117 (G → A) γ^A (Grega-Italiana)	7,1% - 19,0%
	- 158 (C → T) γ^A (Grega)	2,9% - 5,1%
	- 175 (T → C) γ^A (Negra)	36,7% - 38,5%
	- 195 (C → G) γ^A (Brasileira)	4,5% - 7,0%
	- 196 (C → T) γ^A (Italiana)	12,0% - 16,0%
	- 198 (T → C) γ^A (Britânica)	1,8% - 13,0%
	- 202 (C → T) γ^A	1,6% - 3,9%
Deleções	PHHF-1 (Negra)	21,4% - 28,2%
	PHHF-2 (Gana)	21,6% - 27,2%
	PHHF-3 (Indiana)	21,6% - 23,6%
	PHHF-4 (Italiana)	21,0% - 30,0%
	PHHF-5 (Siciliana)	16,0% - 20,0%
	PHHF-6 (Tailandesa)	17,2% - 20,0%

Legenda: γ^G : gene gama glicina; γ^A : gene gama alanina; PHHF: Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal;
* 17.

Delta-Beta Talassemia [$(\delta\beta)^0$ -Talassemia]

A $\delta\beta$ -Talassemia é caracterizada pela expressão persistente dos genes γ -globina durante a vida adulta em associação com a expressão diminuída ou ausente dos genes δ e β -globina, ocasionando aumento nas concentrações de Hb F, além da presença de eritrócitos hipocrômicos e microcíticos¹³. Essa condição genética ocorre por deleções que envolvem os genes δ e β -globina [$\gamma^G\gamma^A(\delta\beta)^0$ -Talassemia] e também o gene γ^A [$\gamma^G(\gamma^A\delta\beta)^0$ -Talassemia]^{1,17-20}. Indivíduos heterozigotos para as mutações de $\gamma^G\gamma^A(\delta\beta)^0$ -Talassemia apresentam variação de Hb F entre 4,0% e 18,6%, enquanto que para as mutações $\gamma^G(\gamma^A\delta\beta)^0$ -Talassemia os níveis de Hb F encontrados variam de 9,3% a 25% (Tabela 2).

Tabela 2: Mutações de $\delta\beta$ -Talassemia associadas com aumento de Hb F e origem étnica.

Tipo de mutação	Etnia	% de Hb F*
$\gamma^G(\gamma^A\delta\beta)^0$	Belga	14,0 % - 23,0%
	Malaia-1	25%
	Negra	17,3% - 21,6%**
	Chinesa	9,3% - 15,7%
	Alemã	9,9% - 12,5%
	Turca	10,0% - 13,0%
$\gamma^G\gamma^A(\delta\beta)^0$	Macedônia	6,7% - 12,8%
	Tailandesa	9,9%
	Leste Europeu	13,0% - 18,0%
	Siciliana	4,0% - 18,6%
	Negra	24,8%**
	Espanhola	5,0% - 13,0%
	Japonesa	7,8%
	Turca	6,0% - 15,0%

Legenda: *¹³; ** Mutações associadas com a presença de Hb S.

Achados do nosso grupo de pesquisa em relação à frequência das mutações $\delta\beta$ -Talassemia Siciliana e $\delta\beta$ -Talassemia Espanhola revelaram a presença apenas da mutação de origem espanhola em três indivíduos com níveis de Hb F iguais a 9,6%, 9,8% e 10,7% (dados não publicados), cujos valores estão dentro da variação esperada para essa mutação¹³.

Polimorfismos genéticos envolvidos na regulação da Hb F

Estudos familiares mostram que os níveis de Hb F elevados tendem a ser herdados, mas muitas vezes o padrão de herança não está claro, e essa característica parece segregar independentemente da família β -globina^{22,23}. A distribuição contínua de Hb F e células F nas populações sugerem que a variabilidade dessa característica não seja proveniente da herança de apenas um *locus* gênico, mas sim da combinação de múltiplos genes localizados em cromossomos diferentes. Dessa forma, em termos genéticos, os altos níveis de Hb F na vida adulta são considerados como uma característica quantitativa, na qual a atuação de múltiplos genes aliados a um componente ambiental pode explicar a ausência de um claro padrão de herança mendeliana em relação à variabilidade de Hb F²⁴.

Em algumas situações, não está claro se a variabilidade genética na família β -globina desempenha um papel determinante em relação à variação da Hb F nas populações. Tal variação é atribuída a co-herança de polimorfismos que afetam regiões reguladoras na família

da β -globina ou próximas a ela. Nesse cenário, foram realizados estudos em busca de genes candidatos, bem como análise de associação, a fim de explicar os elevados níveis de Hb F na vida adulta, acreditando-se que, nessa faixa etária, os níveis elevados de Hb F são herdados como características quantitativas que dependem de muitos *loci* gênicos²⁵.

Estudos de associação de genomas (GWAS) e estudos em famílias mostraram que regiões não pertencentes à família β -globina, dentre elas 2q16, 6q23, 8q e Xp22.2-22.3, estão implicadas na regulação de Hb F²⁶. Aproximadamente 45% da variação nos níveis de Hb F está associada com a presença de três *loci* de característica quantitativa (QTLs) principais, que incluem o polimorfismo *XmnI* no cromossomo 11 (11p15), o *locus HMIP* no cromossomo 6 (6q23) e os SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único) para o gene *BCL11A* no cromossomo 2 (2q16)^{10,27}.

Polimorfismo *XmnI* (- 158 C \rightarrow T) – Cromossomo 11

O polimorfismo *XmnI*, conhecido por influenciar a expressão do gene γ^G , predispõe ao aumento das concentrações de Hb F, particularmente em condições de estresse eritropoiético²⁸. Em pacientes com doença falciforme e talassemia beta, a presença desse polimorfismo está relacionada com níveis mais elevados de Hb F em relação aos indivíduos que não apresentam tais alterações de hemoglobinas²⁹. Na presença desse sítio polimórfico, ocorre aumento na proporção de cadeias γ^G , fazendo com que a taxa das cadeias $\gamma^G:\gamma^A$ atinja valores semelhantes ao que é encontrado ao nascimento, equivalente a 70:30^{30,31}.

Este polimorfismo é comum em muitos grupos populacionais, nos quais a frequência encontrada varia de 32% a 35%²⁹. Estudos realizados por Peri et al. (1997)³² e Garner et al. (2000)²⁴ observaram essa mesma frequência para indivíduos caucasóides e europeus saudáveis. Relatos do nosso grupo de pesquisa verificaram frequência de 33,3% para esse polimorfismo em indivíduos saudáveis, com Hb F variando de 2,0% a 33,3%. O sítio polimórfico *XmnI* foi mais frequente (60%) em indivíduos com níveis de Hb F abaixo de 15% do total de hemoglobinas (dados não publicados).

Para populações que apresentam alterações de hemoglobinas, a frequência do polimorfismo *XmnI* difere do que é relatado para a população saudável. A Tabela 3 evidencia os relatos da literatura em relação aos níveis de Hb F, o fenótipo expresso e a presença do polimorfismo *XmnI* em diferentes grupos populacionais.

Tabela 3: Frequência do polimorfismo *XmnI* e níveis de Hb F em diferentes populações saudáveis e com hemoglobinopatias.

Frequência do polimorfismo <i>XmnI</i>	População estudada	Níveis de Hb F	Fenótipo expresso	Referência
14%	Hong Kong	0,22 ± 0,03 g/dL	Talassemia beta heterozigota	33
14%	Caucasóide	0,34% - 1,07%	Saudáveis	30
3,3%	Arábia Saudita (Sudoeste)	9,3% ± 5,8%	Anemia falciforme	37
93,2%	Arábia Saudita (Oriente)	11,3% ± 6,2%		
39% - 41%	Irã	NA	Talassemia beta intermediária	34
25%	Índia	NA	Talassemia beta maior e intermediária	36
88,1%	Irã	63,0% ± 15,59%	Talassemia beta intermediária	35
70,5%	Irã	NA	Talassemia beta maior	35
33,3%	Brasil	15,48% ± 11,69%	Saudáveis	(dados não publicados)

Os níveis de Hb F associados ao sítio polimórfico *XmnI* são moderados e podem não ser suficientes para explicar a ampla variação fenotípica que é observada em algumas situações³⁸. Ballas et al. (1991)³⁹ revelaram a associação entre a presença do sítio *XmnI* e o aumento na taxa de cadeias $\gamma^G:\gamma^A$, mas não verificaram aumento significativo nos níveis de Hb F. Tais achados são corroborados por Nemati et al. (2009)³¹, que não encontraram relação significativa entre os níveis de Hb F e a presença de *XmnI* em indivíduos iranianos com beta talassemia. De maneira geral, embora a presença do sítio polimórfico *XmnI* mantenha a proporção de cadeias $\gamma^G:\gamma^A$ próxima aos valores encontrados durante a vida fetal, não há necessariamente um aumento nos níveis de Hb F³⁹. Menzel et al. (2007)¹⁰, avaliando a presença desse sítio polimórfico em indivíduos europeus saudáveis, verificaram que o *XmnI* contribui com aproximadamente 10% da variação de células F na população avaliada.

Região 8q – Cromossomo 8

Estudos de associação em famílias de origem indiana identificaram um QTL no cromossomo 8, mais precisamente na região 8q, que apresentou ligação com os níveis

elevados de células F e Hb F. Nesses indivíduos, a presença desse *locus* estava associada à presença do sítio polimórfico *XmnI*. Pesquisadores sugerem que o QTL 8q pode ser responsável por codificar um fator de regulação que atua como repressor ou ativador transcricional, que se liga diretamente ao sítio *XmnI* ou em regiões próximas a ele ⁴⁰.

Região 6q23 (*Locus HMIP*) – Cromossomo 6

Estudos recentes mostram que outro *locus* de característica quantitativa, o *HMIP* na região 6q23, situado na região intergênica HBS1L-MYB, influencia os níveis de Hb F. O gene *HBS1L* está envolvido na regulação de uma gama de processos celulares e é expresso em células da linhagem hematopoiética, enquanto que o gene *MYB* está envolvido na oncogênese e desempenha um papel essencial no processo de eritropoiese ^{27,41}. Acredita-se que a região gênica 6q seja responsável por codificar um fator envolvido na via de maturação eritróide, resultando em aumento nos níveis de células F e Hb F ⁴². Os resultados obtidos por Garner et al. (1998) ⁴² evidenciam a influência do QTL 6q23 na modulação dos níveis de Hb F e na produção de células F em indivíduos beta talassêmicos de origem indiana. No entanto, não está claro se o efeito desse QTL é direto, atuando como um fator que interage com os genes da γ -globina, ou indireto.

Em populações caucasóides, essa região apresenta-se em três blocos de desequilíbrio de ligação, no qual o bloco 2 está mais fortemente associado com a variação de Hb F. A variabilidade existente no bloco 2 da região *HMIP* parece desempenhar um efeito pleiotrópico em alguns parâmetros hematológicos em relação à quantidade de células e volume eritrocitário em indivíduos europeus saudáveis. Essa característica sugere que a região intergênica HBS1L-MYB contém sequências reguladoras distais que atuam nas linhagens eritróides precursoras ⁴¹. A Figura 2 ilustra os três blocos de desequilíbrio de ligação da região 6q23, bem como a relação com diferentes populações.

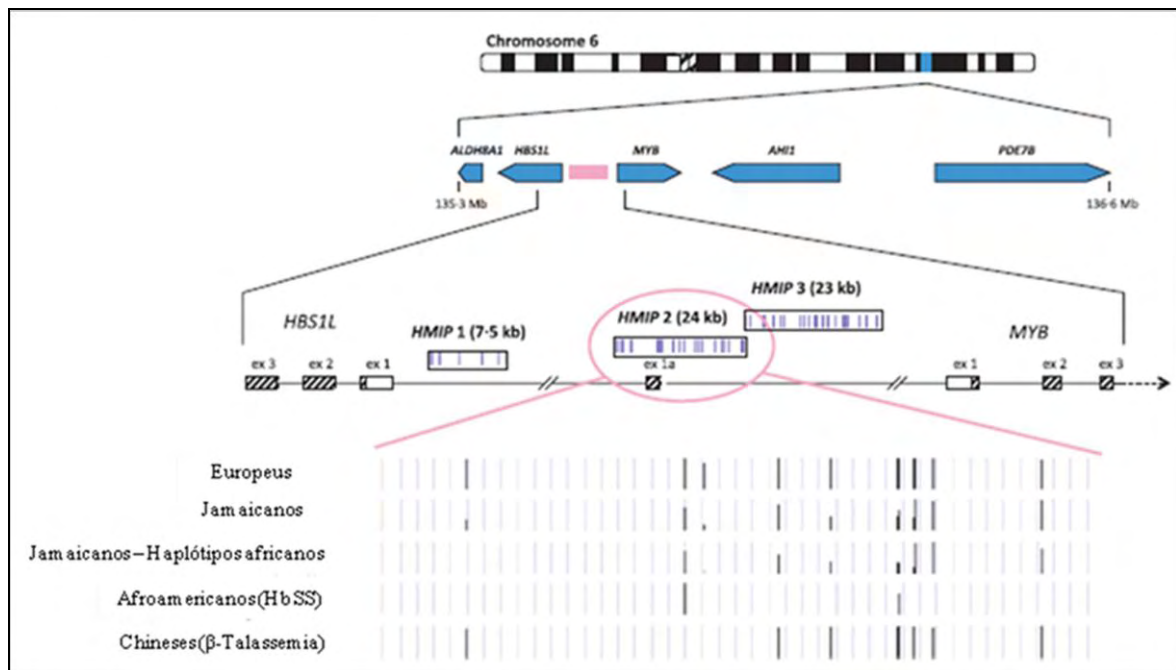


Figura 2: Blocos de desequilíbrio de ligação na região 6q23 e relação existente com diferentes populações²⁷.

Estudos realizados com famílias de origem asiático-indiana identificaram que o *locus* 6q23 apresentava maior associação com os níveis elevados de expressão de Hb F em indivíduos beta talassêmicos. Estes achados revelaram, ainda, que para indivíduos saudáveis e para beta talassêmicos heterozigotos, a presença desse sítio em homozigose estava relacionada com concentrações maiores de Hb F, cujos valores variaram de 1,1% a 3% para os primeiros e de 10% a 24% nos indivíduos com talassemia⁴³.

Em indivíduos saudáveis da região norte da Europa, a presença do *locus* 6q23 contribui com, aproximadamente, 19% da variação nos níveis de Hb F²⁷. Em outros grupos populacionais esse *locus* está presente em indivíduos saudáveis de origem afro-americana e em pacientes com doença falciforme de origem britânica e brasileira, contribuindo com cerca de 3% a 7% da variação de Hb F nessas populações⁴⁴.

Região 2p16 (*BCL11A*) – Cromossomo 2

Outro *locus* de característica quantitativa associado com elevados níveis de Hb F está localizado na região 2q16, no cromossomo 2, e é conhecido como *BCL11A*. Trabalhos realizados por Menzel et al. (2007)¹⁰ encontraram, além do polimorfismo *XmnI* e do *locus* *HMIP*, uma terceira região, 2q16, que apresentava associação com os níveis de Hb F e que contribuía com aproximadamente 15% da variação dessa característica. Relatos da literatura

mostraram que, para determinadas populações, o QTL *BCL11A* é o que apresenta associação mais forte com a variação de Hb F^{10,45}. Avaliando pacientes com beta talassemia maior e intermediária, Uda et al. (2008)⁴⁵ verificaram que o QTL *BCL11A* era mais frequente nos últimos, cujos sintomas clínicos são mais brandos em relação aos primeiros. Lettre et al. (2008)⁴⁴ encontraram resultados semelhantes para pacientes com anemia falciforme afro-americanos e brasileiros, cuja variação de Hb F estava fortemente associada com a presença do QTL *BCL11A*.

A partir desses achados, alguns pesquisadores sugerem que o produto do gene *BCL11A*, um fator de transcrição *zinc-finger*, seja o mediador central no processo de silenciamento dos genes da γ -globina e da troca de expressão desses genes para os genes β -globina⁴⁶. Estudos utilizando células K562 mostraram que o *locus BCL11A* se liga a uma região central no promotor do gene γ -globina para formar um complexo repressor atuando, dessa forma, como um agente silenciador na expressão desse gene⁴⁷. Estudos realizados por Xu et al. (2010)⁴⁸ mostraram que o silenciamento dos genes da γ -globina são resultado da ampla interação que ocorre entre o fator de transcrição BCL11A e a família β -globina, em interação com a cromatina, na formação de um *looping* cromossômico e em associação com outro fator de transcrição, o SOX6, nos promotores dos genes da γ -globina. Tais achados evidenciam que o fator de transcrição BCL11A pode ser considerado um regulador genético no desenvolvimento e controle do silenciamento dos genes da γ -globina em adultos (Figura 3).

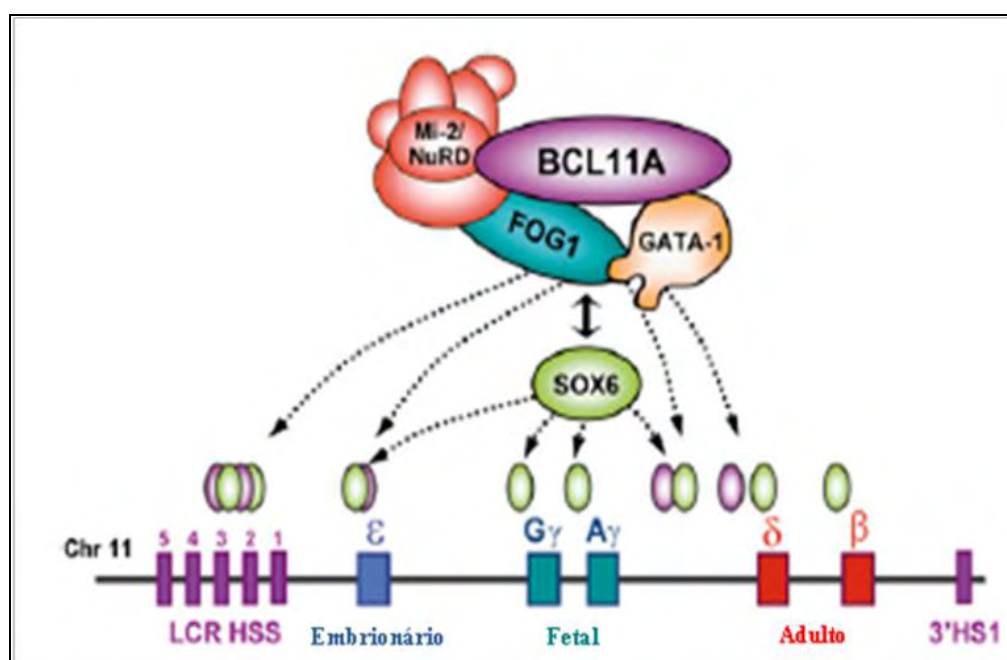


Figura 3: Interação entre fatores de transcrição e BCL11A no silenciamento transcricional dos genes da γ -globina⁴⁸.

Região Xp22.2 – Cromossomo X

Estudos realizados por Dover et al. (1992)⁴⁹, avaliando indivíduos saudáveis e pacientes com anemia falciforme de origem africana, de ambos os gêneros, mostraram que a porcentagem de células F presentes em mulheres, saudáveis e doentes, foi significativamente maior em relação aos homens. A partir desses achados foi sugerido que regiões localizadas no cromossomo X pudessem ser responsáveis por tal diferença. Em busca dessas regiões, foi localizado o *locus* associado à produção de células F na região Xp22.2. De maneira geral, os resultados encontrados por Dover et al. (1992)⁴⁹ sugerem que 70% da variação nos níveis de Hb F em pacientes com anemia falciforme está associado à variação nas porcentagens de células F, que são controladas parcialmente pelo *locus* Xp22.2 no cromossomo X.

Considerações finais

Muitas evidências apontam que a co-herança de determinantes genéticos relacionados aos níveis de Hb F podem desempenhar um papel importante na modulação do fenótipo de pacientes com anemia falciforme e beta talassemia⁴⁰. Dessa forma, a identificação dos genes e das variantes genéticas que contribuem para a variabilidade da produção de Hb F, bem como os mecanismos moleculares envolvidos nessa variação, pode auxiliar na descoberta de novas estratégias terapêuticas e desenvolvimento de agentes farmacológicos para promover o aumento dessa hemoglobina²⁷. Nossos achados revelaram que, para a população avaliada, proveniente da região noroeste do estado de São Paulo, as mutações de PHHF, $\delta\beta$ -Talassemia e polimorfismo *XmnI* estão relacionados à presença de níveis elevados de Hb F em indivíduos adultos e saudáveis, refletindo que uma gama de polimorfismos estão envolvidos na regulação dessa hemoglobina, fato que reforça uma possível característica multiétnica da população brasileira.

Referências:

1. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization*, 2001, 79(8):704-712.
2. Grosveld F, Dillon N, Higgs D. The regulation of human globin gene expression. *Baillieres Clin Hematol*, 1993, 6:31-55.
3. Dillon N, Trimborn T, Strouboulis J, et al. The effect of distance on long-range chromatin interactions. *Mol Cell*, 1997, 1:131-139.
4. Manca L, Masala B. Disorders of the synthesis of Human Fetal Hemoglobin. *Life*, 2008, 60:94-111.
5. Pace BS, Zein S. Understanding Mechanisms of γ -Globin Gene Regulation to Develop Strategies for Pharmacological Fetal Hemoglobin Induction. *Developmental Dynamics*, 2006, 235:1727-1737.
6. Stamatoyannopoulos G. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Exp Hematol*, 2005, 33:259-271.
7. Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia: Fundamentos e Prática*. Edição Revista e Atualizada. Editora Ateneu, 2004.
8. Xu XS, Hong X, Wang G. Induction of endogenous γ -globin gene expression with decoy oligonucleotide targeting Oct-1 transcription factor consensus sequence. *Journal of Hematology & Oncology*, 2009, 2(15):1-11.
9. Miyoshi K, Kaneto Y, Kawai H, et al. X-linked dominant control of F-cells in normal adult life: characterization of the Swiss type as hereditary persistence of fetal hemoglobin regulated dominantly by gene(s) on X chromosome. *Blood*, 1988, 72:1854-1860.
10. Menzel S, Garner C, Gut I, et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nature Genetics*, 2007, 39(10):1197-1199.
11. Steinberg MH. Genetic Etiologies for Phenotypic Diversity in Sickle Cell Anemia. *The Scientific World Journal*, 2009, 9:46-67.
12. Galanello R, Cao A. Relationship between Genotype and Phenotype. *Annals New York of Sciences*, 1998, 850:325-333.
13. Craig JE, Barnetson RA, Prior J, et al. Rapid Detection of Deletions Causing $\delta\beta$ Thalassemia and Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin by Enzymatic Amplification. *Blood*, 1994, 83:1673-1682.

14. Panyasai S, Fucharoen S, Surapot S, et al. Molecular basis and hematologic characterization of $\delta\beta$ -thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin in Thailand. *Haematologica*, 2004, 89:777-781.
15. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. THOMPSON & THOMPSON, *Genética Médica*, 7a ed., Editora Guanabara, 2008.
16. Olave IA, Doneanu C, Fang X, et al. Purification and Identification of Proteins That Bind to the Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin -198 Mutation in the γ -Globin Gene Promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(2):853-862.
17. Huisman HJ, et al. HbVar: A database of Human Hemoglobin variants and Thalassemias. Summaries of mutation categories. Pennsylvania University USA and McMaster University in Canada, 1996. Disponível em <http://globin.cse.psu.edu/>>. Acesso em 20 de Maio de 2010.
18. Collins FS, Stoeckert CJ Jr, Serjeant CR, et al. Gamma beta⁺ hereditary persistence of fetal hemoglobin: cosmid cloning and identification of a specific mutation 5' to the γ gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81:4894-4898.
19. Craig JE, Rochette J, Sampietro M, et al. Genetic heterogeneity in heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Blood*, 1997, 90:428-454.
20. Forget BG. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, 850:38-44.
21. Andrade TG. Análise molecular de deficiências gênicas associadas à Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal e Delta Beta Talassemias. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2002.
22. Martinez G, et al. A case of hereditary persistence of foetal haemoglobin caused by a gene not linked to the β -globin cluster. *Human Genetics*, 1989, 82:335-337.
23. Thein SL, Weatherall DJ. A non-deletion hereditary persistence of foetal hemoglobin (HPFH) determinant not linked to the beta-globin gene complex. In: *Hemoglobin Switching*, New York, Alan R Liss Inc, 1989.
24. Garner C, Tatu T, Reittie JE, et al. Genetic influences on F cells and other hematologic variables: a twin heritability study. *Blood*, 2000, 95:342-346.
25. Thein SL, Menzel S. Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. *British Journal of Haematology*, 2009, 145:455-467.
26. Nguyen TKT, Joly P, Bardel C, et al. The XmnI γ polymorphism influences hemoglobin F synthesis contrary to BCL11A and HBS1L-MYB SNPs in a cohort of 57 β -thalassemia intermedia patients. *Blood Cells Mol Diseases*, 2010.
27. Thein SL, Menzel S, Lathrop M, et al. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. *Human Molecular Genetics*, 2009, 18:216-223.

28. Grosso M, Amendolara M, Rescigno G, et al. Delayed decline of γ -globin expression in infant age associated with the presence of $G\gamma$ -158 (C \rightarrow T) polymorphism. *Int Jnl Lab Hem*, 2008, 30:191-195.
29. Thein SL. Genetic insights into the clinical diversity of β -thalassaemia. *British Journal of Haematology*, 2004, 124:264-274.
30. Sampietro M, Thein SL, Contreras M, et al. Variation of Hb F and F-cell number with the $G\gamma$ *XmnI* (C-T) polymorphism in normal individuals. *Blood*, 1992, 79(3):832-833.
31. Nemati H, Rahimi Z, Bahrami G. The *XmnI* polymorphic site 5' to the $G\gamma$ gene and its correlation to the $G\gamma$: $A\gamma$ ratio, age at the first blood transfusion and clinical features in β -Thalassemia patients from Western Iran. *Mol Biol Rep*, 2009.
32. Peri KG, Gagnon J, Gagnon C, et al. Association of 158 (C \rightarrow T) (*XmnI*) DNA polymorphism in G [γ]-globin promoter with delayed switchover from fetal to adult hemoglobin synthesis. *Pediatr Res*, 1997, 41:214-217.
33. Gibney GT, Panhuysen CIM, So JCC, et al. Variation and heritability of Hb F and F-cells among β -thalassemia heterozygotes in Hong Kong. *Am J Hematol*, 2008, 83:458-464.
34. Karimi M, et al. Beta thalassemia intermedia from southern Iran: IVSII.1 (G:A) is the prevalent thalassemia intermedia allele. *Hemoglobin*, 2002, 26:147-154.
35. Neishabury M, Azarkeiven A, Najmabadi H. Frequency of positive *XmnI* Ggamma polymorphism and coinheritance of common alpha thalassemia mutations do not show statistically significant difference between thalassemia major and intermedia cases with homozygous IVSII-1 mutations. *Blood Cells Mol Dis*, 2010, 44:95-99.
36. Nadkarni A, Gorakshakar AC, Lu CY, et al. Molecular pathogenesis and clinical variability of beta-thalassemia syndromes among Indians. *Am J Hematol*, 2001, 68:75-80.
37. El-Hazmi MAF. *Xmn I* polymorphism in the Gamma-globin gene region among Saudis. *Hum Hered*, 1989, 39:790-792.
38. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, et al (eds). *Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management*. Cambridge University Press, Cambridge, 2001.
39. Ballas SK, Talacki CA, Adachi K, et al. The *XmnI* site (-158, C \rightarrow T) 5' to the G gamma gene: correlation with the Senegalese haplotype and G gamma globin expression. *Hemoglobin*, 1991, 15:393-405.
40. Garner CP, Tatu T, Best S, et al. Evidence of Genetic Interaction between the β -Globin Complex and Chromosome 8q in the Expression of Fetal Hemoglobin. *Am J Hum Genet*, 2002, 70:793-799.
41. Wahlberg K, et al. The *HBSIL-MYB* intergenic interval associated with elevated HbF levels shows characteristics of a distal regulatory region in erythroid cells. *Blood*, 2009, 114:1254-1262.

42. Garner C, Mitchell J, Hatzis T, et al. Haplotype Mapping of a Major Quantitative-Trait Locus for Fetal Hemoglobin Production, on Chromosome 6q23. *Am J Hum Genet*, 1998, 62:1468-1474.
43. Craig JE, Rochette J, Fisher CA, et al. Dissecting the loci controlling fetal haemoglobin production on chromosomes 11p and 6q by the regressive approach. *Nature Genetics*, 1996, 12:58-64.
44. Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MA, et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and γ -globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *PNAS*, 2008, 105:11869-11874.
45. Uda M, Galanello R, Sanna S, et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105:1620-1625.
46. Sankaran VG, Menne TF, Xu J, et al. Human foetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science*, 2008, 322:1839-1842.
47. Chen Z, Luo HY, Steinberg MH, et al. BCL11A represses HBG transcription in K562 cells. *Blood Cells Mol Dis*, 2009, 42:144-149.
48. Xu J, Sankaran VG, Ni M, et al. Transcriptional silencing of γ -globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. *Genes & Development*, 2010, 24:783-798.
49. Dover GJ, Smith KD, Chang YC, et al. Fetal Hemoglobin Levels in Sickle Cell Disease and Normal Individuals Are Partially Controlled by an X-Linked Gene Located at Xp22.2. *Blood*, 1992, 80:816-824.

8.2 **Apêndice B:** Artigo científico submetido à revista Genetics and Molecular Research (ISSN:1676-5680. Fator de Impacto: 0,682).

Evaluation of mutations to HPFH and $\delta\beta$ -Thalassemia in a Brazilian group with higher levels of Hb F.

Gisele Cristine de Souza Carrocini¹, Luciana de Souza Ondeí², Paula Juliana Antoniazco Zamaro¹, Claudia Regina Bonini-Domingos¹

¹ Departamento de Biologia, Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo.

² Universidade Estadual de Goiás, UEG, Unidade Universitária de Porangatu, Goiás.

Abstract

Fetal hemoglobin (Hb F) is characteristic of the fetal development period. However, in some genetic conditions, as in Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH) and Delta-beta Thalassemia ($\delta\beta$ -Thalassemia), Hb F continues to be produced in adulthood. The aim of this study was to evaluate the frequency of two mutation of HPFH, HPFH-1 and HPFH-2 African, and two mutations to $\delta\beta$ -Thalassemia, Sicilian and Spanish, in Brazilian population. We analyzed 60 samples of peripheral blood of adults from Southeast and Northeast Brazil hospital and blood centers, of both gender, healthy and without complaints of anemia and whose Hb F was increased. Samples were submitted to electrophoretic and chromatographic tests to quantify the Hb F values and, subsequently, to molecular analysis to verify the mutations. In molecular analysis, 16 samples (26.67%) showed heterozygous profile for HPFH mutations investigated, two for HPFH-1 and 14 for HPFH-2. For the same sample set were found three heterozygous (5.0%) for Spanish $\delta\beta$ -Thalassemia and the Sicilian $\delta\beta$ -Thalassemia were not verified. The values of Hb F in heterozygotes for HPFH-2 evaluated disagreed with the findings in the literature for this mutation. Our results showed that for the group assessed the HPFH mutations are more frequent than $\delta\beta$ -Thalassemia mutations. In the analyzed samples, the mutation HPFH-2 was associated with Hb F levels different from that preconized in the literature for this mutation. The presence of the mutations evaluated in this study reflects the mixing process occurred in the formation of the Brazilian population.

Key-words: Hb F, HPFH-1, HPFH-2, Spanish $\delta\beta$ -Talassemia, Sicilian $\delta\beta$ -Talassemia.

Introduction

Fetal Hemoglobin (Hb F) is a globular protein composed by two alpha and two gamma globin chains ($\alpha_2 \gamma_2$). The levels of Hb F usually decline in a few months after the birth, to less than 1% of total hemoglobin. However, in some genetic conditions, a high level of this Hb continues in adulthood (Stamatoyannopoulos and Nienhuis, 1994; Weatherall and Clegg, 2001).

Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH) is a condition resulting from lack change from gamma to beta globin synthesis, reflected by a substantial production of gamma globin, and therefore, of Hb F (Nussbaum et al., 2008). This condition is associated either with the occurrence of single point mutations in promoter region in two gamma chains, which lead to an increased rate of genes γ^G and γ^A transcription, or β -globin gene cluster deletions, that remove the δ and β -globin genes (Hoyer et al., 2002; Gibney et al., 2008; Grosso et al., 2008).

Deletions in HPFH are associated with removal of silencer elements in the region between γ and δ -globin genes or removal of enhancer elements in the proximity of the γ -globin genes (Weatherall, 2001). Heterozygous carriers of HPFH present Hb F levels ranging from 16% to 30.0% and normal red blood cells. The HPFH mutations are related to different ethnic backgrounds and include seven deletions mutations, among them Black, Ghanaian, Indian, Vietnamese, Thai, Italian and Sicilian types (Huisman et al., 1996).

Delta-beta Thalassemia ($\delta\beta$ -Thalassemia) is characterized by persistent expression of γ -globin genes in adult in association with decreased or absence of δ and β -globin genes expression, leading to increased of Hb F concentrations, and presence of hypochromic and microcytic erythrocytes (Forget, 1998; Weatherall and Clegg, 2001). The $\delta\beta$ -thalassemia is characterized by occurrence of large deletions involving the δ and β -globin genes (Hoyer et al., 2002). Heterozygous carriers of $\delta\beta$ -thalassemia ($\delta\beta^0$) show Hb F levels ranging from 4% to 18.6%. The $\delta\beta$ -thalassemia mutations also are related to different ethnic groups and include several deletional mutations as Turkish, German, Japanese, Black, Sicilian and Spanish types, among others (Huisman et al., 1996).

Elevated Hb F levels are known to improve the clinical manifestations of the two largest known hemoglobin changes: sickle cell disease and beta thalassemia. In sickle cell disease, the Hb F concentration and distribution among the red blood cells are the main genetic modulators of disease, whereas high levels of this hemoglobin dilutes the amount of Hb S, inhibiting or delaying the polymerization process, which results in reduced disease

severity (Steinberg, 2009). In homozygous beta thalassemia, increased production of gamma chains helps in reducing the imbalance of alpha and non-alpha chains and increasing total hemoglobin levels (Galanello and Cao, 1998; Thein, 2004). In subjects without hemoglobin alterations, Hb F can be found in high concentrations, which makes the expression pattern of gamma genes important target a range of studies.

The aim of this study was to determine the frequency of two HPFH mutations, HPFH-1 (Black) and HPFH-2 (Ghanaian), and two $\delta\beta$ -thalassemia mutations, Sicilian and Spanish, by Gap-PCR and compare respective mutations with the Hb F concentration in adults, which were previously diagnosed with increased Hb F.

Material and Methods

Study Group

60 peripheral EDTA-blood samples of adults individuals were collected and analyzed after obtaining informed consent from Southeast and Northeast Brazil hospital and blood centers, who had no clinical symptoms of anemia and whose Hb F was increased. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Sao Paulo State University, Unesp. Samples were separated into two groups according to the Hb F concentrations: I group, with Hb F ranging from 2.0 to 15.0% (34 samples) and II group, with Hb F levels above 15.0% (26 samples). The classification of samples into these groups was established according to the variation of Hb F concentrations described in the literature for mutations of $\delta\beta$ -thalassemia, 4.0 to 18,6%, and HPFH deletions, 16.0 to 30.0% (Huisman et al., 1996).

Hemoglobin Analyses

All samples were submitted to the conventional hemoglobinopathies diagnosis methods, which included globular osmotic resistance in NaCl 0.36% (Silvestroni and Bianco, 1975), erythrocyte morphology analysis (Bonini-Domingos, 2006) and electrophoresis at alkaline pH (Marengo-Rowe, 1965). In addition to these analyses, electrophoresis in agar-phosphate in pH 6.2 (Vella, 1968) and analyses by HPLC (Variant Bio-Rad) to obtain quantitative Hb values, were carried out. The samples were also subjected to electrophoresis of polypeptide chains in acidic pH (Alter et al., 1980) and quantification of γ^G and γ^A globin chains by densitometry (Densitometer CELM), in order to evaluate the percentage content.

Molecular Analyses

The DNA extraction from peripheral whole blood was performed by phenol-chloroform (Pena et al., 1991) and molecular analysis by Gap-PCR (Craig et al., 1994). The choice of mutations evaluated in this study is justified by the fact that the technique of Gap-PCR is functional for the deletions in which breakpoints are already well defined (Old, 2003). Three primers used for the analysis of mutations HPFH-1 (A1: 5'-AGAATGTCACACTTAGAATCTG-3'; A2: 5'-CACTTTAATTCTGGTCTACCTGAA-3'; A3: 5'-ACTGTGATGTTGGAAATGGAC-3'), HPFH-2 (B1: 5'-GACATGGACTATTGTTCAATGA-3'; B2: 5'-TGCTATGCCAACTCACTACC-3'; B3: 5'-TTTATATATGAAATGCTACTGATT-3') and Sicilian $\delta\beta$ -thalassemia (F1: 5'-TTGGGTTTCTGATAGGCACTG-3'; F2: 5'-GTGTCACCCATTAATGCCTTGTAC-3'; F3: 5'-TAGATCCCTTTGCCATTATG-3') and analysis protocols were described by Craig et al. (1994). Three primers used for the analysis of Spanish $\delta\beta$ -thalassemia (N1: 5'-ATGGGTATTTCACTTGTTAT-3'; N2: 5'-ACTTTGTCTGTTAATTCAA-3'; N3: 5'-ACTGTGGAGCCCCTTTCTG-3') mutation were described by Vives-Corróns et al. (1991) and analysis protocols were described by Craig et al. (1994). The amplicons were electrophoresed in 1.2% agarose gel containing ethidium bromide and photographed under UV light through Image Capture System L-PIX Touch (Loccus Biotechnology). The size of the fragments obtained after amplification for the mutations analyzed are summarized in Table 1.

Table 1: Sizes of the fragments after reaction amplification for analyzed mutations.

Fragment size	Normal homozygous	Heterozygote	Mutant homozygous
HPFH-1	1616 bp	1616 bp + 1193 bp	1193 bp
HPFH-2	2206 bp	2206 bp + 1950 bp	1950 bp
Sicilian $\delta\beta$ -Thalassemia	1585 bp	1585 bp + 1150 bp	1150 bp
Spanish $\delta\beta$ -Thalassemia	685 bp	685 bp + 299 bp	299 bp

Legend: bp = bases pairs

Statistical Analyses

We used the Chi-Square (χ^2) and T-test for parametric data and Mann-Withney Test for nonparametric data. The software used in the analysis was Statistica 8.0 (Statsoft™). The *p* value less than 0.05 was considered to indicate statistical significance.

Results

Among the 60 samples, 51.67% (31 samples) of individuals were female and 48.33% (29 samples) were male subjects. The average values of Hb F in respect to gender was not significantly different ($p = 0.94$), since these values were equal to 16.64% ($\pm 11.96\%$) for women and 16.98% ($\pm 11.45\%$) for men.

In the groups studied, the average values of Hb F were higher in II group (28.88% $\pm 5.84\%$) than I group (7.56% $\pm 3.59\%$). In relation to the classical tests of hemoglobinopathies diagnostic, both groups showed samples with positive osmotic resistance and microcytic and hypochromic red blood cells with mild to moderate alterations.

The results of hemoglobinopathies diagnostic tests were statistically analyzed and the comparison of the groups showed a significant difference between them in the erythrocyte morphology ($p=0.01$, $\chi^2=8.94$). Groups I and II differed in relation to the presence of mild morphological alterations ($p=0.003$, $\chi^2= 8.554$). In I group, two samples (5.88%) presented these alterations, whereas in II group these changes were found in nine samples (34.61%). There were no significant differences between groups regarding the presence of moderate alterations ($p=0.14687$) and normal erythrocytes ($p=0.237$).

The results of polypeptide chains electrophoresis acid pH allowed for the quantification of globin chains γ^A and γ^G , in order to evaluate their percentage content. The most samples had higher percentages of γ^A chains in relation to γ^G chains. However, these differences did not allow to define the genotype of the individual, and thus, highlighted the need for molecular studies for such evaluation.

Of the 60 samples analyzed, 19 (31.67%) showed the investigated mutations. For the HPFH mutations, 16 individuals (26.67%) presented heterozygous status, one sample (1.67%) belonging to the group I and 15 (25.0%) from group II. Of these 16 samples, two (12.5%) were heterozygous for HPFH-1, both in the group II, and 14 (87.5%) were heterozygous for HPFH-2, one in the group I and 13 in the group II. For $\delta\beta$ -thalassemia mutations, we found

three (5.0%) heterozygotes for Spanish $\delta\beta$ -thalassemia. In contrast, there were no heterozygous samples for the Sicilian $\delta\beta$ -thalassemia.

The two heterozygotes for HPFH-1 showed Hb F levels equivalent to 22.0% and 29.0%, which are close to the Hb F levels found in the literature for this mutation. Among the 14 samples heterozygous for HPFH-2, only one had levels of Hb F (25.9%) consistent with the literature data for this mutation. Seven samples showed Hb F levels higher than those found in the literature, ranging from 30.3% to 38.1%, and six samples showed Hb F levels lower, ranging 10.0% to 21.2%. Hb F levels were compared between the heterozygotes for evaluated HPFH mutations and those individuals without such mutations. Statistical analyses showed significant differences ($p < 0.0001$) in the mean values of Hb F in heterozygotes (26.42%, $\pm 7.64\%$) in relation to normal subjects (13.29%, $\pm 9.55\%$).

The three individuals heterozygous for the Spanish $\delta\beta$ -Thalassemia mutation showed Hb F levels equivalent to 9.6%, 9.8% and 10.7%, corroborating data of literature regarding the concentrations of Hb F for this mutation.

Table 2 shows the minimum and maximum Hb F values found in heterozygous samples for both HPFH and Spanish $\delta\beta$ -Thalassemia mutations, compared with the values found in the literature for the same mutations.

Table 2: Comparison between the minimum and maximum Hb F values (%) found for the HPFH-1 and HPFH-2 mutations compared with literature data.

Mutation	Min-Max values of Hb F found in heterozygous samples (%)	Min-Max values of Hb F found in the literature*
HPFH-1 (Black)	22.0 – 29.0	21.4 – 28.2
HPFH-2 (Ghanaian)	10.0 – 38.1	21.6 – 27.2
Spanish $\delta\beta$ -Thalassemia	9.6 – 10.7	5.0 – 13.0

Min-Max: minimum and maximum values.

*(Huisman et al., 1996).

Discussion

According to the literature, heterozygotes for HPFH mutations have Hb F levels between 16.0% and 30.0% and between 4.0% to 18.6% for $\delta\beta$ -Thalassemia mutations (Huisman et al., 1996). The results of this study demonstrated that Brazilian individuals with increased Hb F may have Hb levels ranging from 22.0% to 29.0% for HPFH-1 mutations and 10.0% and 38.1% for HPFH-2 mutations. These results show a variation in the Hb F levels in

heterozygotes for HPFH, especially in HPFH-2 mutation, since that one sample was found with a value of 10.0% for Hb F. This data may reflect a possible intrinsic characteristic of the analyzed population. In case of the Spanish $\delta\beta$ -Thalassemia mutation, levels of Hb F corroborate the values found in the literature concerning this mutation.

Besides the differences found in the Hb F concentrations, differences were also observed in the results of conventional diagnostic tests for study groups. Differences in erythrocyte morphology showed that individuals with levels of Hb F between 2% and 15% present greater frequency of moderate alterations, though not statistically significant; furthermore, the individuals with concentrations of Hb F higher than 15% of total hemoglobin showed a predominance of mild morphological alterations. This result was not expected for this group, since samples with values of Hb F suggesting the presence of HPFH mutations have normal red blood cells (Hoyer et al., 2002). This same group showed the greatest amount of heterozygotes for the two HPFH investigated mutations, indicating that individuals without hemoglobin alterations who are carrying mutations, may have alterations in erythrocytes morphology and globular osmotic resistance, a fact that can also be associated with intrinsic characteristics of the studied population. Based on the quantification of gamma globin chains, our findings corroborate the literature regarding the prevalence of γ^A chains in adult life (Zago et al., 2004).

The presence of heterozygotes for both HPFH mutations and for Spanish $\delta\beta$ -thalassemia in this study confirm data concerning the Brazilian population formation and reinforce the influence of mixing processes, especially with regard to the African ethnic groups, whereas mutations of African origin were more frequent in relation to Mediterranean origin. Among many immigrants who have come to Brazil, there was an excess of black immigrants who, jointly with Amerindian and European, give rise to tri-hybrid population (Pena, 2000).

The absence of Sicilian $\delta\beta$ -thalassemia mutation in study groups indicates that this genetic factor is not associated with increased expression of γ genes in the sample population. This observation suggests that other mutations related to increased levels of HbF in adults should be assessed. We conclude that the HPFH mutations have a greater influence in the Brazilian population in relation to the $\delta\beta$ -thalassemia mutations. Hb F levels in heterozygous carrying HPFH mutations vary from 10.0% to 38.1%. The presence of these findings suggests the influence of African and European ethnicities and consequent mixing which occurred during the process of Brazilian population formation.

Acknowledgments

We thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (contract grant number: 2007/07887-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (contract grant number: 130607/2009-6) for financial support.

References:

- Alter BP, Gooff SC, Efremov GD, Gravely ME, et al. (1980). Globin chain electrophoresis: a new approach to the determination of the gamma G/gamma A ratio in fetal haemoglobin and to studies of globin synthesis. *Br J Haematol.* 44(4): 527-532.
- Bonini-Domingos CR (2006). Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemia. 1st edn. HN Press, São José do Rio Preto (SP).
- Craig JE, Barnetson RA, Prior J, Raven JL, et al. (1994). Rapid Detection of Deletions Causing Delta beta Thalassemia and Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin by Enzymatic Amplification. *Blood.* 83: 1673-1682.
- Forget BG. (1998). Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann NY Acad Sci.* 850: 38-44.
- Galanello R, Cao A. (1998). Relationship between genotype and phenotype. Thalassemia intermedia. *Ann NY Acad Sci.* 850: 325-333.
- Gibney GT, Panhuysen CI, So JC, Ma ES, et al. (2008). Variation and heritability of Hb F and F-cells among beta-thalassemia heterozygotes in Hong Kong. *Am J Hematol.* 83: 458-464.
- Grosso M, Amendolara M, Rescigno G, Danise P, et al. (2008). Delayed decline of γ -globin expression in infant age associated with the presence of Ggamma-158 (C \rightarrow T) polymorphism. *Int J Lab Hematol.* 30(3): 191-195.
- Hoyer JD, Penz CS, Fairbanks VF, Hanson CA, et al. (2002). Flow Cytometric measurement of hemoglobin F in RCBs: Diagnostic usefulness in the distinction of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH) and Hemoglobin S-HPFH from other condition with elevated levels of hemoglobin F. *Am J Clin Pathol.* 117(6): 857-863.
- Huisman HJ, et al. (1996). HbVar: A database of Human Hemoglobin variants and Thalassemias. Summaries of mutation categories. Pennsylvania University USA and McMaster University in Canada. In <http://globin.cse.psu.edu/>, checked April 26th 2010.
- Marengo-Rowe AJ. (1965). Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. *J Clin Pathol.* 18(6): 790-792.
- Nussbaum RL, McInnes RR and Willard HF (2008). Thompson & Thompson: Genética Médica. 7th edn. Elsevier Press, Rio de Janeiro (RJ).

Old JM. (2003). Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood Rev.* 17(1): 43-53.

Pena SD, Macedo AM, Gontijo NF, Medeiros AM, et al. (1991). DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. *Electrophoresis.* 12: 146-152.

Pena SD (2000). Retrato molecular do Brasil. *Ciência Hoje.* 27: 16-25.

Silvestroni E and Bianco I. (1975). Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. *Am J Hum Genet.* 27(2): 198-212.

Stamatoyannopoulos G and Nienhuis AW (1994). Hemoglobin switching. In: *The Molecular Basis of Blood Diseases* (Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW, Varmus H, editors). 2nd edn. WB Saunders Company Press, Philadelphia, 107-155.

Steinberg MH. (2009). Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *ScientificWorldJournal.* 9: 46-67.

Thein SL. (2005). Genetic modifiers of beta-thalassaemia. *Haematologica.* 90(5): 649-660.

Vella F. (1968). Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobins. *Am J Clin Pathol.* 49(3): 440-442.

Vives-Corrons JL, Pujades MA, Miguel A, et al. (1991). Screening of Spanish ($\delta\beta^0$) thalassemia by polymerase chain reaction (PCR). Combined Meeting of British Society for Haematology and British Society for Haemostasis and Thrombosis, Glasgow, 20-22 March 1991, Abstracts. *Br J Haematol.* 77 Suppl 1: 1-84.

Weatherall DJ and Clegg JB (2001). *The Thalassemia Syndromes.* 4th edn. Oxford Blackwell Science.

Weatherall DJ. (2001). Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassemyias. *Nat Rev Genet.* 2(4): 245-255.

Zago MA, Falcão RP and Pasquini R (2004). *Hematologia: Fundamentos e Prática.* 1st edn. Ateneu Press, São Paulo (SP).

8.3 **Apêndice C:** Resultados dos testes clássicos de triagem de hemoglobinas e análise molecular para as mutações de P^HH^F, $\delta\beta$ -Talassemia, polimorfismo X^mmI e haplótipos β -globina.

ID	HbF	HbA ₂	RO	ME	P ^H H ^F		$\delta\beta$ -Talassemia		Haplótipos β -globina							
					P ^H H ^F -1	P ^H H ^F -2	$\delta\beta$ -Tal Siciliana	$\delta\beta$ -Tal Espanhola	H ⁰ H ¹ (X ^m mI)	H ² H ³	H ³ H ⁴	H ⁵ H ⁶	H ⁷ H ⁸	P ¹ P ⁵	SF1SF2	Haplótipo
GI01	2	2,6	+	+ / + (M, H, PQ)	N	N	N	N	(++)	(+)	(-)	(+)	(++)	(+)	(+)	Atp 1 / Atp 2
GI02	2,4	2,7	-	N / + (M, H, PQ)	N	*	N	N	(-)	(+)	(-)	(+)	(++)	(+)	(+)	Atp 3 / V
GI03	2,9	3,2	-	Normocitose	N	N	N	N	(+)	(+)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)	II / Atp 2
GI04	3	3,8	-	N / + (M, H, PQ)	N	N	N	N	(-)	(+)	(-)	(+)	(++)	(+)	(+)	Atp 3 / V
GI05	3,2	2,7	-	+ / + (M, H, PQ)	N	N	N	N	(-)	(+)	(-)	(+)	(++)	(+)	(+)	Atp 4 / V
GI06	3,3	1,9	-	+ / + (M, H, PQ)	N	N	N	N	(-)	(+)	(-)	(+)	(++)	(+)	(+)	Atp 4 / V
GI07	3,7	2,7	-	+ / + (M, H, PQ)	N	N	N	N	(+)	(+)	(-)	(+)	(++)	(+)	(+)	Atp 1 / V
GI08	4,3	2,4	-	N / + (M, H, PQ)	N	N	N	N	(+)	(+)	(-)	(+)	(++)	(+)	(+)	IX / I
GI09	4,3	2,9	-	N / + (M, H, PQ)	N	N	N	N	(-)	(+)	(-)	(+)	(++)	(+)	(+)	Atp 5 / I
GI10	4,4	3,2	+	+ / + (M, H, PQ)	N	N	*	N	(-)	(+)	(-)	(+)	(++)	(+)	(+)	Atp 1 / V
GI11	4,6	2,8	-	+ / + (M, H, PQ)	N	N	N	N	(+)	(+)	(-)	(+)	(++)	(+)	(+)	Atp 1 / V
GI12	4,9	2,3	-	N / + (M, H)	N	N	N	N	(+)	(+)	(-)	(+)	(++)	(+)	(+)	Atp 6 / V
GI13	6,2	6,5	-	+ (M, H)	N	N	N	N	(-)	(+)	(-)	(+)	(++)	(+)	(+)	Atp 4 / I
GI14	6,3	3,2	-	N / + (M, H, PQ)	N	N	N	N	(+)	(+)	(-)	(+)	(++)	(+)	(+)	Atp 1 / Atp 2
GI15	6,4	2,4	+	N / + (M, H, PQ)	N	N	N	N	(-)	(+)	(-)	(+)	(++)	(+)	(+)	Atp 7 / I
GI16	6,8	2,7	+	+ / + (M, H, PQ)	N	N	N	N	(+)	(+)	(+)	(+)	*	*	*	
GI17	7,7	3,1	-	Normocitose	N	N	N	N	(-)	(+)	(-)	(+)	(++)	(+)	(+)	
GI18	8	2,4	-	N / + (PQ); + / + (M, H, PQ)	N	N	N	N	(-)	(+)	(-)	(+)	(++)	(+)	(+)	Atp 3 / V
GI19	8,2	1,9	-	N / + (M, H)	N	N	N	N	(-)	(+)	(-)	(+)	(++)	(+)	(+)	Atp 7 / V

Anexo

9 Anexo

Técnicas Laboratoriais

Preparação de Hemolisados

Para que as amostras de sangue periférico fossem submetidas a análises eletroforéticas, foi preciso provocar a lise da membrana dos eritrócitos, de modo a obter uma solução de hemoglobinas. Foram realizados dois tipos de hemolisados de hemoglobina:

- Hemolisado rápido com Saponina (NAOUM, 1999):

Princípio:

É um procedimento realizado quando as amostras sanguíneas apresentam suspeitas de hemoglobinas instáveis e talassemia do tipo alfa.

Reativo hemolisante:

- Saponina P.A.1 g
- Água destilada q.s.p.....100 mL

Procedimento:

Adicionou-se o volume de 50 µL de sangue periférico ao volume de 100 µL de reativo hemolisante em uma placa de Kline. Logo após realizou-se a homogeneização até obter a hemólise total da mistura. Este hemolisado foi utilizado depois de 5 minutos de preparo, mas nunca ultrapassando 24 horas.

- Solução de Hemoglobina com Clorofórmio (NAOUM, 1999):

Princípio:

É um método utilizado para dosagem de Hb F, Hb A₂ e metahemoglobina. O hemolisado obtido apresenta de 10 a 15g/dL de hemoglobina.

Procedimento:

Foi centrifugado 1mL de sangue periférico colhido com anticoagulante EDTA, com solução salina a 0,85%, a 1500 rpm (rotações por minuto) por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e os eritrócitos foram lavados, com solução salina, por duas a três vezes. Aos glóbulos vermelhos lavados, adicionou-se o mesmo volume de água destilada. Após homogeneização, essa mistura recebeu um volume de clorofórmio igual ao volume da mistura, sendo centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos. O hemolisado foi transferido para um tubo de ensaio identificado com o código dos indivíduos.

Resistência Globular Osmótica em Cloreto de Sódio a 0,36% (SILVESTRONI; BIANCO, 1975)*Princípio:*

Esta técnica avalia a resistência dos eritrócitos á hemólise. Resultados positivos para este teste são encontrados em heterozigose para hemoglobina C e, principalmente, em casos de beta talassemia heterozigota, em que os eritrócitos microcíticos presentes são mais resistentes ao processo de hemólise.

Reagentes:

Solução Estoque NaCl a 10% pH 7,4:

- NaCl9,00 g
- Na₂HPO₄1,36 g
- NaH₂PO₄.H₂O0,28 g
- Água destilada q.s.p100 mL
- Manter refrigerado e aquecer a 37° C para preparação da solução trabalho.

Solução trabalho:

- NaCl 10%36 mL
- Água destilada q.s.p1000 mL
- Manter em temperatura ambiente.

Procedimento:

Colocar 2,0 mL de solução de NaCl a 0,36% em um tubo de hemólise e adicionar 10 µL de sangue total. Agitar suavemente por inversão e aguardar 10 minutos para a interpretação.

Interpretação:

O tubo de hemólise com a solução é colocado a 2,0 cm de uma folha branca com listras negras, de forma que amostras negativas para o teste permitem uma fácil visualização das listras, enquanto que amostras positivas não permitem essa visualização, já que a resistência aumentada à hemólise torna a amostra opaca.

Análise da Morfologia Eritrocitária (BONINI-DOMINGOS, 2006)

Consiste na análise do tamanho, da forma e da quantidade de Hb nos eritrócitos em esfregaço. Em casos de talassemia beta heterozigota, os eritrócitos apresentam microcitose, hipocromia e moderada anisopoiquilocitose. A interpretação dos resultados segue padronização do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas – LHGDH/UNESP:

- Alterações discretas: (+)
- Alterações moderadas: (++)
- Alterações acentuadas: (+++)
- Células normais: (N)

Análises Eletroforéticas

Após a preparação dos hemolisados, foram realizados os seguintes procedimentos eletroforéticos.

1 - Eletroforese em pH alcalino em acetato de celulose (MARENGO-ROWE, 1965, com modificações):

Princípio:

Utilizada para qualificar as hemoglobinas normais e grande parte das hemoglobinas anormais. Alterações nas cargas elétricas das hemoglobinas anormais, causadas por substituições de aminoácidos diferentes nas cadeias globínicas, promovem mobilidades eletroforéticas variadas.

Reagentes:

Tampão TRIS-EDTA-BORATO (TEB) pH 8,6

- Tris hidroximetil aminometano..... 10,2 g
- Ácido etilenodiaminotetracético0,6 g
- Ácido Bórico..... 3,2 g
- Água destilada q.s.p1000 mL
- Conservar em geladeira.

Corante:

Ponceau:

- Ponceau S0,5 g
- Ácido tricloroacético5,0 g
- Água destilada q.s.p100 mL

Solução descorante:

- Ácido acético glacial.....100 mL
- Metanol..... 50 mL
- Água destilada q.s.p..... 1000 mL

Procedimento:

Após estarem submersas em tampão TEB, por 15 minutos, as fitas de acetato de celulose foram secas, com auxílio de papel absorvente. Depois de secas, as fitas foram colocadas na cuba de eletroforese e os compartimentos eletrolíticos conectados com auxílio de papel filtro. O hemolisado de hemoglobinas foi aplicado nas fitas com distância de 1,0 cm da extremidade que estava em contato com o pólo negativo, recebendo 300 volts por 30 minutos. As frações globínicas foram, primeiramente, observadas sem qualquer coloração e, depois, coradas com Ponceau. Para a coloração, as fitas foram submersas no corante por 5 minutos e, posteriormente, embebidas em solução descorante por 30 minutos.

Interpretação:

Consultar o mapa de diferenciação das disposições de hemoglobinas em eletroforese em pH alcalino (Figura 9).

2 - Eletroforese de diferenciação em ágar-fosfato, pH 6,2 (VELLA, 1968):*Princípio:*

Técnica específica para detectar hemoglobinas anormais que, em eletroforese em pH alcalino, migram na mesma posição da Hb A, dificultando a identificação correta das mesmas. Além disso, este método propicia a caracterização semiquantitativa da Hb F.

Reagentes:

Tampão Fosfato pH 6,2 - Para uso nos compartimentos eletrolíticos e confecção do gel.

- Na_2HPO_4 2,02 g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 7,66 g
- Água destilada q.s.p1000 mL
- Conservar em geladeira.

Gel de Ágar:

- Ágar.....500 mg
- Tampão fosfato pH 6,225 mL

Procedimento:

Misturou-se o ágar e o tampão fosfato em um erlenmeyer de 250 mL até a completa dissolução do primeiro. A mistura foi levada ao microondas para que o gel pudesse ser formado. Pipetou-se 5,0 mL do gel em uma lâmina de microscópio, deixando-as gelificar à temperatura ambiente. Após a gelificação, as amostras foram aplicadas na porção média da lâmina com muita cautela, de modo a não danificar o gel. Utilizou-se papel filtro para promover a conexão entre o gel e os compartimentos eletrolíticos, passando 100 volts durante 30 minutos. As lâminas foram coradas, com o corante Ponceau, a fim de permitir uma melhor observação e interpretação das frações de hemoglobina obtidas.

Interpretação:

Consultar o mapa de diferenciação das disposições de hemoglobinas em eletroforese em pH ácido (Figura 9).

3 - Eletroforese de Cadeias Polipeptídicas:

Princípio:

É uma técnica utilizada para detectar hemoglobinas anormais que não foram identificadas pelos métodos usuais de quantificação e qualificação das mesmas. A eletroforese de cadeias polipeptídicas promove a separação das cadeias globínicas, constituindo uma análise pré-molecular que se mostra, muitas vezes, conclusiva para o diagnóstico de hemoglobinas anormais. A eletroforese de cadeias polipeptídicas em pH ácido permite uma boa visualização das globinas gama glicina (γ^G) e gama alanina (γ^A).

- Eletroforese de Cadeias Polipeptídicas em pH Ácido (ALTER et al., 1980, com modificações):

Técnica que permite a separação das frações de globinas por suas afinidades diferenciadas em pH ácido. Possibilita boa visualização das globinas gama. É uma metodologia bastante precisa para a separação de globinas, podendo também ser utilizada para quantificação das frações.

Reagentes:

Solução estoque gel poliacrilamida 60:0,4

- Acrilamida15,0 g
- Bis- acrilamida0,1 g
- Água destilada q.s.p.25 mL

Uréia 8M

- Uréia12 g
- Água destilada q.s.p..... 25 mL

2 – Mercaptoetanol 1M

- 2 - Mercaptoetanol35 µL
- Água destilada q.s.p..... 500 µL

Tampão para Corrida – Ácido acético 5%

- Ácido acético glacial50 mL
- Água destilada q.s.p..... 1000 mL

Gel de poliacrilamida 12%

- Solução estoque2,5 mL
- Ácido acético625 µL
- Uréia 8M9,375 mL
- Triton X-100250 µL
- Persulfato de amônio a 25%30 mg
- TEMED100 µL

Tampão de amostra

- Uréia 8M1,25 mL
- Ácido acético glacial125 µL
- 2- mercaptoetanol125 µL
- Pironina Y1 mg

Corante Comassie Blue

- Comassie G ou R 250.....0,1g
- Ácido acético.....3,5 mL
- Etanol.....25 mL
- Água destilada q.s.p.....50 mL

Preparação do gel de poliacrilamida:

Foram misturadas a solução estoque de acrilamida-bisacrilamida (60: 0,4%), a uréia 8M, o ácido acético glacial, o persulfato de amônio e o TEMED. A solução do gel foi colocada nas placas, onde recebeu o molde para a formação das canaletas. O gel foi polimerizado após 30 minutos, em temperatura aproximada de 30°C. Depois de polimerizado,

foi realizado um procedimento de homogeneização do pH entre o gel e o tampão, que consistiu na submissão do gel a 200 volts por 1 hora, com tampão ácido acético 5% nos compartimentos eletrolíticos, e o pólo positivo no topo. O tampão de corrida nos compartimentos eletrolíticos foi trocado. Retirou-se o excesso de tampão das canaletas e, em seguida, 10 µL de 2 – mercaptoetanol 1M foram aplicados em cada canaleta. O gel foi submetido a 150 volts por 1 hora.

Preparação da amostra:

Um volume de 100 µL de sangue com solução salina a 0,85% foi centrifugado a 1500 rpm, durante 5 minutos, de modo que o sobrenadante foi desprezado. Esse processo foi repetido por quatro vezes. Ao volume de eritrócitos lavados, foi adicionado 10 vezes o volume de água destilada, para romper os mesmos e liberar, dessa forma, a hemoglobina. A preparação das amostras para aplicação consistiu na mistura de 1,5 µL do hemolisado obtido, com 10 µL do tampão de amostra.

Procedimento:

As amostras foram aplicadas e submetidas à corrente constante de 50mA (200 V) por 3 horas. Posteriormente foram coradas com Comassie Blue para a visualização das cadeias polipeptídicas.

Análise Cromatográfica (INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, 2006)

Princípio:

A análise de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) foi realizada no equipamento automatizado VARIANT (BIO-RAD) com o Kit de análise para Beta Talassemia Heterozigota. O Kit é utilizado para quantificação de Hb F e Hb A₂ e caracterização de Hb S, Hb C, Hb D Los Angeles e outras hemoglobinas variantes por meio de janelas específicas, com tempo de retenção, padrão cromatográfico e porcentagem dos diferentes picos. Consiste da cromatografia de troca iônica em sistema fechado, no qual duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição, com controles de gradientes pré-programados, passa pela coluna eluindo às amostras que são detectadas em absorvância de 415 nm. Um filtro secundário de 690 nm corrige a linha de base para os efeitos provocados pela mistura de tampões com forças iônicas diferentes. As mudanças na absorvância são monitoradas e exibidas em cromatograma da absorvância versus tempo. Os dados de análise

provenientes do detector são processados e impressos no relatório da amostra de acordo com o tempo de retenção de cada fração de Hb.

Procedimento:

Foram misturados 5 µL de sangue total com 1,0 mL de solução hemolisante, fornecida no kit de análise, em um tubo. Após hemólise total dos eritrócitos, as amostras foram acondicionadas nos recipientes adequados e alojadas no equipamento. Os procedimentos foram realizados conforme a pré-programação de leitura das amostras.

Interpretação:

A quantificação das diferentes frações de hemoglobina em uma amostra foi realizada a partir dos valores de porcentagem e tempo de retenção, comparados com os valores de calibração específicos, fornecidos pelo fabricante, e emitidos em modelo próprio que incluiu valores numéricos e perfil cromatográfico. Os valores de Hb A₂ considerados normais foram de 2,5 a 3,5 % e os de Hb F até 1,0%, previamente estabelecidos pelo fabricante.

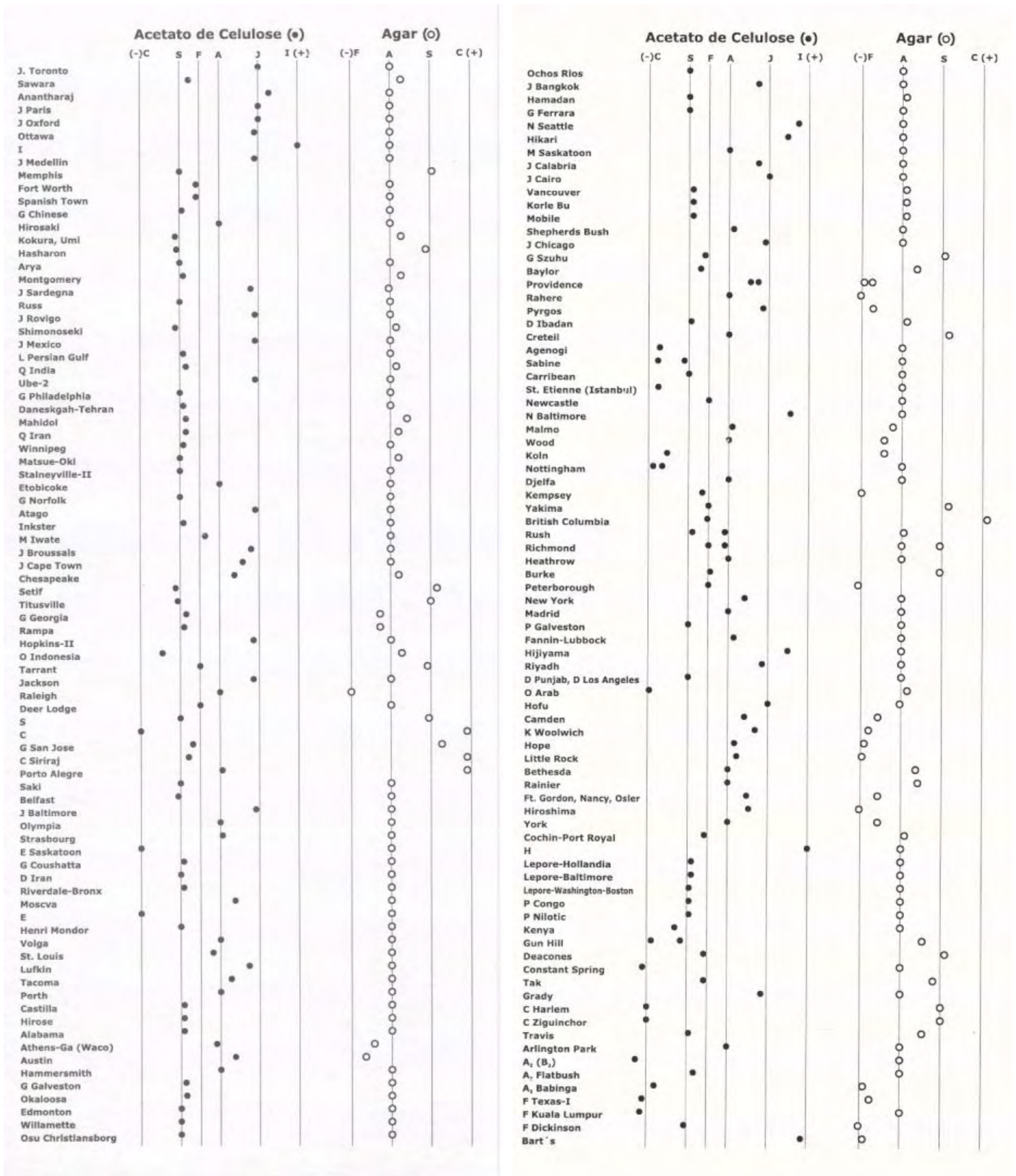


Figura 9: Traçado eletroforético em pH alcalino e ácido das principais hemoglobinopatias (BONINI-DOMINGOS, 2006).

Referências:

ALTER, B.P.; GOOF, S.C.; EFREMOV, G.D.; et al. Globin chain electrophoresis: a new approach to the determination of the G/A ratio in fetal haemoglobin and to studies of globin synthesis. **Br. J. Haematol.**, v. 44, p.527-532, 1980.

BONINI-DOMINGOS, C.R. **Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemia**. Editora HN, 121 p, 2006.

INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, 2006.

MARENGO-ROWE, A.J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetato. **Journal of Clinical Pathology**, v. 18, n. 6, p. 790-792, 1965.

NAOUM, P.C. **Eletroforese, Técnicas e Diagnósticos**. 2 ed. São Paulo: Editora Santos, 1999.

SILVESTRONI, E.; BIANCO, I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. **Am. J. Hum. Genet.** v. 27, p. 198-212, 1975.

VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis oh human hemoglobins. **American Journal of Clinical Pathology** v. 49, n. 3, p. 440-442, 1968.