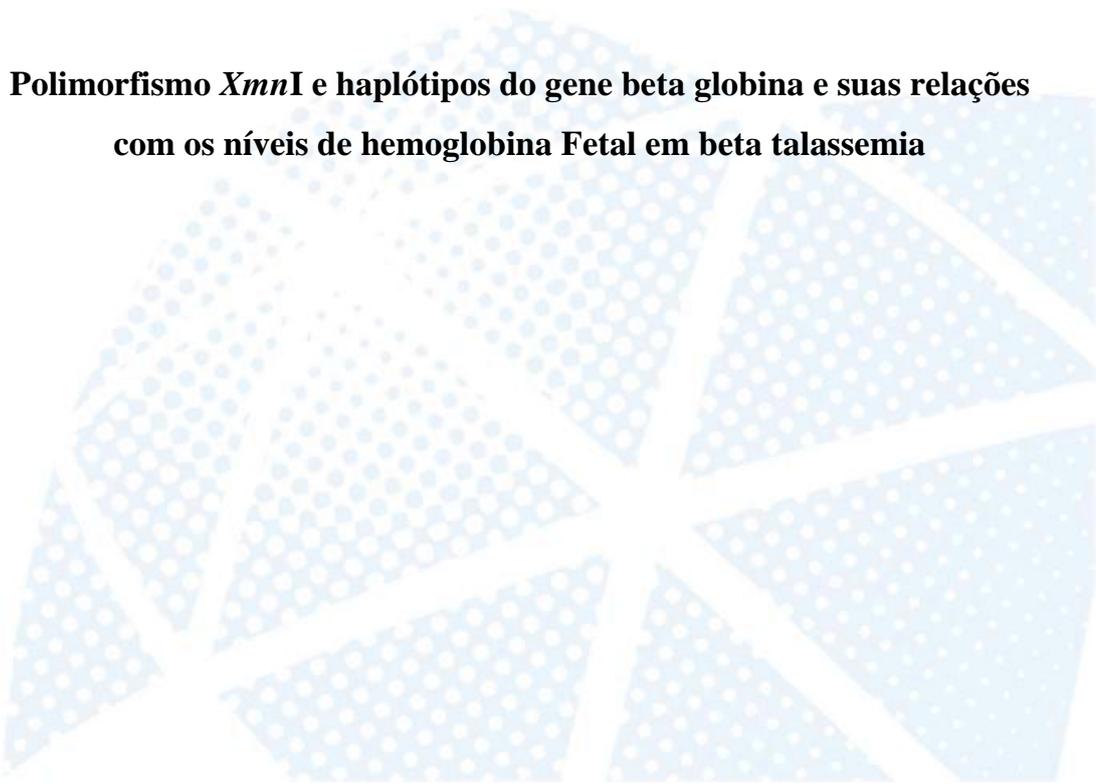


Isabela Sandrin Chinelato

**Polimorfismo *Xmn*I e haplótipos do gene beta globina e suas relações
com os níveis de hemoglobina Fetal em beta talassemia**



Isabela Sandrin Chinelato

Polimorfismo *Xmn*I e haplótipos do gene beta globina e suas relações com os níveis de hemoglobina Fetal em beta talassemia

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.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto - SP

2014

Chinelato, Isabela Sandrin.

Polimorfismo XmnI e haplótipos do gene beta globina e suas relações com os níveis de hemoglobina fetal em beta talassemia / Isabela Sandrin Chinelato -- São José do Rio Preto, 2014
102 f. : il., tabs.

Orientador: Claudia Regina Bonini-Domingos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética humana. 2. Talassemia. 3. Hemoglinopatia.
4. Polimorfismo (Genética). I. Bonini-Domingos, Claudia Regina.
II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 616.155

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

Isabela Sandrin Chinelato

Polimorfismo *Xmn*I e haplótipos do gene beta globina e suas relações com os níveis de hemoglobina Fetal em beta talassemia

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

Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos
Professora Assistente do Departamento de Biologia
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-
IBILCE

Profa. Dra. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
Professora Assistente do Departamento de Biologia e
Zootecnia
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-
FEIS

Dra. Isabeth da Fonseca Estevão
Hematologista do Centro de Especialidades Municipal de
São Carlos

São José do Rio Preto, 17 de fevereiro de 2014.

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 da CAPES.

“Aos os outros eu dou o direito de ser como são, a mim, dou o dever de ser cada dia melhor”

(Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, saúde e minha família, por tudo o que conquistei até hoje e pelas vitórias que ainda virão.

*Aos meus pais, **Carlos Alberto Chinelato e Zélia Aparecida Sandrin Chinelato**, por serem as pessoas mais importantes da minha vida, exemplos de retidão, caráter, dedicação e amor. Vocês são os motivos que me fazem sempre querer ser uma pessoa melhor e tudo que faço, é pensando em vocês.*

*Aos meus irmãos, **Guilherme Sandrin Chinelato e Vitor Sandrin Chinelato**, pelo carinho, apoio e por compartilharem momentos maravilhosos. Vocês são essenciais no meu dia a dia.*

*À **Polly** (in memoriam) por todo amor, amizade, companheirismo. Por estar presente desde sempre e estará para sempre em nossos corações. Te amo muito minha pretinha!!!*

*A toda minha família **Sandrin e Chinelato**, sempre apoiando todas as minhas decisões e estando presente nos momentos mais importantes da minha vida.*

*As minhas amigas **RHYCAS (Gi, Japa, Lari, Lidi, Mini, Mugs, Urbs e Zazu)** que de colegas de trabalho se tornaram cúmplices e amigas pra todos os momentos, desde uma crise existencial até grandes conquistas. Sem vocês tudo seria mais sem graça e difícil. Vocês são inesquecíveis*

*Aos amigos do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH/CEQ): **Larissa, Gisele, Tiago, Paula, M. Isabel, Danilo, Belini, Vinicius, Lidiane, Jéssika, Willian, Vanessa Urbinatti, Vanessa Leiko, Jéssica, Renan, Bárbara, Giovana, Marina, Mariana, Lucas, Gabriela, Luis Felipe, Edoardo** e à todos aqueles que passaram pelo laboratório, obrigada pelos momentos de discussão, aprendizagem, amizade e muita diversão.*

*À **Larissa, Danilo, Gisele, Jéssika e Lidiane** por sempre estarem dispostos a contribuir nas análises laboratoriais e estatísticas deste estudo.*

*Às **Dras. Isabeth da Fonseca Estevão e Luciana de Souza Onde** pelas grandes contribuições acadêmicas e auxílio na obtenção das amostras.*

*Às **Dras. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni e Ana Elizabete Silva** pelas valiosas contribuições no exame de qualificação.*

*À **Dra. Viviani de Lourdes Rosa Pessoa (HEMORIO)**, pelo auxílio na obtenção das amostras e consultas aos prontuários.*

*À minha orientadora, **Profa Dra Claudia Regina Bonini Domingos** pela confiança, paciência, ensinamentos, amizade, orientação e pela formação acadêmica.*

*À **CAPES** pela minha bolsa de estudos.*

RESUMO

As talassemias do tipo beta são afecções genéticas frequentes na população mundial e seus portadores podem apresentar elevação nos níveis de hemoglobina A₂ (Hb A₂) e hemoglobina fetal (Hb F). As mutações presentes nos indivíduos podem estar associadas a diferentes haplótipos do grupamento da β-globina. Os objetivos do trabalho consistiram em investigar as frequências do polimorfismo *XmnI* (-158 C→T) e do padrão de haplótipos da β-globina em indivíduos heterozigotos e homozigotos para a beta talassemia, relacioná-las com os níveis de Hb F, e compará-las com indivíduos sem hemoglobinopatias. Foram analisadas 150 amostras de indivíduos beta talassêmicos heterozigotos; 22 de indivíduos homozigotos e 150 de indivíduos sem hemoglobinopatias (grupo controle). Todas as amostras foram submetidas aos testes clássicos de diagnóstico de hemoglobinopatias e à análises moleculares por PCR Alelo Específico (PCR-AE) para confirmação da mutação de beta talassemia, e PCR para polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) para a identificação do polimorfismo *XmnI* e dos sítios de haplótipos da β-globina. Os testes estatísticos foram realizados com o software STATISTICA 8.0 e Haploview 4.2. Nos indivíduos beta talassêmicos heterozigotos, a mutação CD39 foi a mais frequente (62%) e nos homozigotos, a IVS-I-6 (22%). Foi observada diferença significativa nos níveis de Hb F entre os indivíduos que possuem mutações ainda não identificadas, em relação aos que possuem a mutação IVS-I-110 ($p < 0,05$), no grupo de heterozigotos. A presença do polimorfismo *XmnI* foi observada em todos os grupos estudados, porém, somente para os indivíduos com talassemia beta heterozigota houve diferença estatística em relação aos níveis aumentados de Hb F ($p = 0,007$). Nos três grupos foram observados os padrões típicos de haplótipos I, II, IV, VI, VII e IX. Para os indivíduos com beta talassemia heterozigota, os padrões II (24,3%) e VII (32%) foram os mais frequentes; para os indivíduos com beta talassemia homozigota os padrões I (29,5%) e VII (38,6%) e para os indivíduos sem hemoglobinopatias, os padrões de haplótipos I (31%) e VII (28,3%). Houve diferença significativa nos níveis de Hb F entre os indivíduos heterozigotos que apresentaram os padrões de haplótipos I e IV ($p = 0,007$). Ainda em relação aos níveis de Hb F, o haplótipo típico IV esteve relacionado aos maiores níveis nos indivíduos com beta talassemia heterozigota. Foram observados 16 padrões atípicos, sendo que um desses, encontrado apenas pelo software Haploview, sendo denominado de Atípico 16*. Em relação às manifestações clínicas, observadas nos 22 indivíduos com beta talassemia homozigota, dez deles foram classificados como intermediários e 12 como maiores. Todos os indivíduos apresentaram sobrecarga de ferro no fígado e apenas um indivíduo apresentou sobrecarga de ferro no coração, devido, principalmente ao regime transfusional intenso a que são submetidos. Ainda nos talassêmicos homozigotos, a presença do polimorfismo *XmnI* foi observada em quatro indivíduos, sendo três deles classificados clinicamente como beta talassêmicos intermediários. Concluímos que as mutações CD39 e IVS-I-6 foram as mais observadas nos indivíduos com beta talassemia da Região Sudeste; o polimorfismo *XmnI* foi observado nos três grupos de estudo e sua presença esteve relacionada a níveis elevados de Hb F em indivíduos beta talassêmicos heterozigotos. Os padrões típicos de haplótipos mais observados nos três grupos foram: I, II e VII, o que reflete o perfil genético da nossa população de estudo, revelando origens étnica mediterrâneas e turcas, devido ao intenso processo de miscigenação.

Palavras-chave: beta talassemia; polimorfismo *XmnI*; haplótipos β-globina; Hb F.

ABSTRACT

The beta thalassemia are frequent genetic disorders and sufferers may have increased levels of hemoglobin A₂ (Hb A₂) and fetal hemoglobin (Hb F). The mutations present in individuals may be associated with different haplotypes of β -globin grouping. The objectives of this study consisted in investigating the frequencies of the XmnI polymorphism (-158 C→T) and the pattern of the β -globin haplotypes in heterozygous and homozygous individuals for beta thalassemia, relate them to the levels of Hb F, and compare them with individuals without hemoglobinopathies. We analyzed 150 samples from heterozygous individuals with beta thalassemia, 22 homozygous and 150 individuals without hemoglobinopathies (control group). All samples were tested for classical hemoglobinopathies diagnosis and molecular analyzes Allele Specific PCR (AE-PCR) to confirm the mutation of beta thalassemia and PCR length polymorphism restriction fragment (PCR-RFLP) for identification of the polymorphism XmnI and sites of the β -globin haplotypes. Statistical tests were performed using STATISTICA 8.0 and Haploview 4.2 software. In beta thalassemia heterozygous individuals, mutation CD39 was the most common (62%) and in homozygous was the IVS-I-6 (22 %). We observed a significant difference in the levels of Hb F among the unidentified mutations and IVS-I-110 ($p < 0.05$) in heterozygous individuals. The presence of the XmnI polymorphism was observed in all groups, but only heterozygous individuals for beta thalassemia was statistical difference in relation to increased levels of Hb F ($p = 0.007$). In the three groups were observed haplotype patterns I, II, IV, VI, VII and IX. For individuals heterozygous to beta thalassemia, the patterns II (24.3 %) and VII (32 %) were the most frequent, for individuals with beta thalassemia homozygous, the patterns I (29.5 %) and VII (38.6 %) and individuals without hemoglobinopathies, the patterns I (31%) and VII (28.3%). There was significant difference in Hb F levels between patterns I and IV for heterozygous individuals ($p = 0.007$). Also in relation to the levels of Hb F, the typical IV haplotype have been related to highest levels in individuals with heterozygous beta thalassemia. 16 atypical patterns were observed, and one of these patterns was found only by Haploview software, being named Atypical 16 *. Regarding clinical manifestations observed in 22 patients with homozygous beta thalassemia, ten individuals were classified as intermediate and 12 as major. All individuals had iron overload in the liver and only one had iron overload in the heart, mainly due to the intensive transfusion regimen to which these individuals are subjected. In those homozygotes, the presence of XmnI polymorphism was observed in four individuals, three of them clinically classified as beta thalassemia intermediate. We conclude that CD39 and IVS-I-6 mutations were more frequent in patients with beta thalassemia in the Southeast; XmnI polymorphism was observed in the three study groups and their presence was related to high levels of Hb F in individuals heterozygous to beta thalassemia. The most typical patterns of haplotypes observed in the three groups were: I, II and VII. The typical patterns of haplotypes more observed in the three groups were: I, II and VII, which reflects the genetic profile of our study population, revealing ethnic origins Mediterranean and Turkish, due to the intense process of miscegenation.

Keywords: beta thalassemia, XmnI polymorphism, β -globin haplotypes, Hb F.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Famílias α e β globina e a disposição de seus genes funcionais.	17
Figura 2: Órgãos e cadeias globínicas responsáveis pela eritropoese e síntese das hemoglobinas.....	18
Figura 3: Sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β -globina.....	23
Figura 4: Fluxograma com os testes da triagem básica e complementares	30
Figura 5: Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-AE para a mutação CD39.....	39
Figura 6: Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-AE para a mutação IVS-I-110...	40
Figura 7: Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-AE para a mutação IVS-I-6.....	41
Figura 8: Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-AE para a mutação IVS-I-1.....	42
Figura 9: Foto do gel de agarose 1,5% com fragmentos de DNA obtidos após a digestão dos fragmentos para a região da γ^G	47
Figura 10: Gráfico ilustrando a distribuição das mutações observadas nos indivíduos com beta talassemia heterozigota.....	51
Figura 11: Gráfico ilustrando a distribuição das mutações observadas nos indivíduos com beta talassemia homozigota.....	51
Figura 12: Padrões de haplótipos observados nos indivíduos com beta talassemia heterozigota.	56
Figura 13: Padrões de haplótipos observados nos indivíduos com beta talassemia homozigota.	56
Figura 14: Padrões de haplótipos observados nos indivíduos sem alterações de hemoglobinas.	56
Figura 15: Frequência dos haplótipos β -globina em indivíduos beta talassêmicos heterozigotos.	59
Figura 16: Frequência dos haplótipos β -globina em indivíduos beta talassêmicos homozigotos.	60
Figura 17: Esquema representativo de desequilíbrio de ligação para o grupo controle versus talassêmicos.....	63
Figura 18: Esquema representativo de desequilíbrio de ligação para o grupo controle versus beta talassemia heterozigota.....	63
Figura 19:Esquema representativo de desequilíbrio de ligação para o grupo controle versus beta talassemia homozigota.....	64
Figura 20: Esquema representativo de desequilíbrio de ligação para os beta talassêmicos heterozigotos versus os homozigotos.....	64
Figura 21: Manifestações clínicas em indivíduos com beta talassemia homozigota.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Origem e fenótipo das mutações de beta talassemia.	22
Tabela 2: Sequências e tamanho dos fragmentos amplificados com os pares de oligonucleotídeos sintetizados para o sequenciamento genômico e definição das mutações de talassemia beta.....	43
Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de regiões da família β -globina.....	45
Tabela 4: Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas da família β -globina	45
Tabela 5: Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas da família β -globina.	46
Tabela 6: Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição.	46
Tabela 7: Esquema de cores para os blocos de haplótipos, utilizando o software Haploview 4.2.	48
Tabela 8: Resultado do sequenciamento dos indivíduos com beta talassemia homozigota.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Atp	atípico
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD	códon
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
D`	desequilíbrio de ligação
DMSO	dimetil sulfóxio
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etinoadaminotetracético
et al.	e outros
<i>HBA1</i>	gene alfa 1
<i>HBA2</i>	gene alfa 2
<i>HBB</i>	gene beta
<i>HBD</i>	gene delta
<i>HBE</i>	gene épsilon
<i>HBG1</i>	gene gama alanina
<i>HBG2</i>	gene gama glicina
<i>HBZ</i>	gene zeta
Hb	hemoglobina
Hb A	hemoglobina Adulta (normal)
Hb A ₂	hemoglobina adulta normal (fração minoritária)
Hb C	hemoglobina C
Hb F	hemoglobina fetal
HCl	ácido clorídrico
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
IVS	região de intron
Kb	kilo base
KCl	cloreto de potássio
LCR	região controladora do <i>locus</i>
LOD	probabilidade dos polimorfismos estarem ligados
MgCl ₂	cloreto de magnésio

Na ₂ HPO ₄	fosfato de sódio dibásico anidro
NaCl	cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	fosfato de sódio monobásico monohidratado
pb	pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-AE	Reação em cadeia da polimerase por Alelo Específico
PCR-RFLP	Reação em cadeia da polimerase – Polimorfismo de tamanho por
fragmento de restrição	
q.s.p	quantidade suficiente para
SDS	dodecil sulfato de sódio
T2*	tempo 2* de relaxamento
TEB	Tris-EDTA-Borato
Tris	tris (hidroximetil) aminometano

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
ζ	zeta
ε	epsílon
γ^G	gama glicina
γ^A	gama alanina
δ	delta
β	beta
ψ	psi- referente à pseudogene
β^+	beta mais talassemia
β^0	beta zero talassemia
∞	infinito

LISTA DE UNIDADES

g/dL	gramas por decilitro
M	molar
mg	mili grama
mL	mili litro
mM	mili molar
ms	mili segundo
RCF	força centrífuga relativa
μ L	micro litro
U/mL	unidade de enzima por mili litro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Hemoglobinas Humanas.....	17
1.2	A Hemoglobina Fetal e sua relação com as beta hemoglobinopatias.....	19
1.3	Talassemias.....	19
1.3.1	Beta talassemia	20
1.4	Mutações da beta talassemia.....	21
1.5	Sítio Polimórfico <i>XmnI</i> (-158 C→T).....	22
1.6	Haplótipo β-globina.....	22
1.7	Manifestações Clínicas na Beta talassemia Maior	24
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	Objetivo Geral	27
2.2	Objetivos Específicos	27
4.	Relacionar a influência dos sítios polimórficos nas manifestações clínicas em beta talassêmicos homozigotos.	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Casuística.....	29
3.2	Metodologia.....	29
3.2.1	Testes Clássicos para o Diagnóstico de Hemoglobinopatias	30
3.2.2	Análises Moleculares	35
3.3	Análise Estatística.....	47
4	RESULTADOS	50
4.1	Caracterização da Amostra.....	50
4.1.1	Presença das mutações de beta talassemia	50
4.1.2	Níveis de hemoglobina fetal (Hb F) em relação às mutações de beta talassemia ...	52
4.2	Polimorfismo <i>XmnI</i>	52
4.3	Haplótipos da Beta Globina.....	54
4.3.1	Frequência dos haplótipos e desequilíbrio de ligação (Haploview 4.2).....	61
4.4	Manifestações Clínicas	65
5	DISCUSSÃO.....	67
6	CONCLUSÕES.....	74
	REFERÊNCIAS.....	76
	APÊNDICES.....	82

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hemoglobinas Humanas

A molécula de hemoglobina (Hb) é uma proteína globular oligomérica composta por quatro subunidades: duas cadeias do tipo alfa-globina (α) e duas do tipo beta-globina (β), formando um tetrâmero proteico, cuja principal função é o transporte de gases respiratórios dos pulmões para os tecidos e vice versa (WALKER, 1990; SCHECHTER, 2008; COSTA et al., 2012). Cada subunidade da Hb é composta por duas porções: a fração proteica, com as globinas, e a fração prostética (grupo heme), que contém o ferro. As hemoglobinas encontradas em indivíduos normais incluem a Hb A ($\alpha_2\beta_2$), Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) e Hb F ($\alpha_2\gamma_2$). Cada uma dessas frações tem concentrações bem definidas em cada fase do desenvolvimento, sendo que em adultos, os níveis de Hb A variam de 96% a 98%; de 2,5% a 3,5% para a Hb A₂ e de 0% a 1% para a Hb F (XU et al., 2009).

Os genes da hemoglobina humana estão localizados em duas famílias gênicas, denominadas α (alfa) e β (beta) globina. A família α -globina localiza-se na região telomérica do braço curto do cromossomo 16 (16p13.3) e codifica uma cadeia polipeptídica com 141 aminoácidos. Possui os genes funcionais *zeta* (*HBZ* ou ζ) e *alfa* (*HBA2* ou α_2 e *HBA1* ou α_1). A família β -globina está localizada no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5), e codifica uma cadeia polipeptídica que apresenta 146 aminoácidos. Essa família é constituída pelos genes *épsilon* (*HBE* ou ϵ), *gama-glicina* (*HBG2* ou γ^G), *gama-alanina* (*HBG1* ou γ^A), *delta* (*HBD* ou δ) e *beta* (*HBB* ou β) (HONIG; ADAMS III, 1986; WEATHERALL; CLEGG, 2001). A Figura 1 ilustra a disposição desses genes, nas duas famílias, em seus respectivos cromossomos.

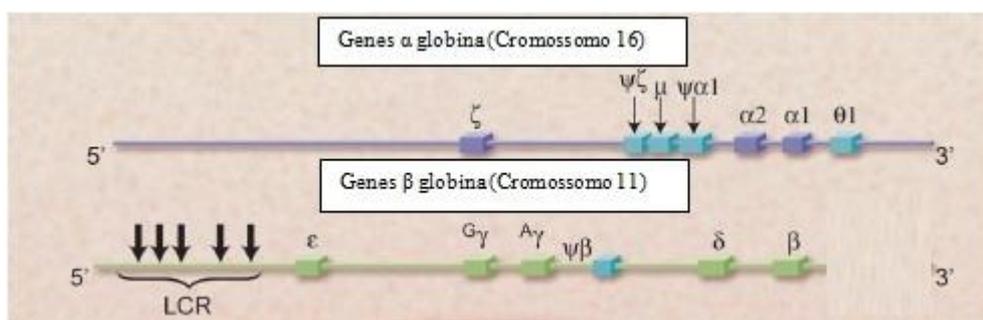


Figura 1: Famílias α e β globina, localizadas nos cromossomos 16 e 11 respectivamente e a disposição de seus genes funcionais. LCR: região controladora do locus (Modificado de SCHECHTER, 2008).

Os eritrócitos expressam os genes pertencentes às famílias da α e β -globina, com mudança na expressão em dois estágios distintos do desenvolvimento: do período embrionário para o fetal; e do período fetal para o adulto. No período embrionário são produzidas as hemoglobinas Portland I ($\zeta_2\gamma_2$), Portland II ($\zeta_2\beta_2$), Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$) e Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$), no período fetal é produzida a Hb F e no período pós nascimento ocorre inversão, havendo a síntese das Hb A e Hb A₂ (WEATHERALL; CLEGG, 2001; SCHECHTER, 2008; HIGGS et al., 2012).

A partir da quarta semana de gestação começa a ser produzida a Hb F, que tem sua síntese aumentada progressivamente durante o desenvolvimento do feto. A Hb A tem sua síntese iniciada a partir da décima semana de gestação, mantendo-se em concentrações próximas a 10% até o nascimento (HONIG; ADAMS III, 1986; NAOUM, 1997; NUSSBAUM et al., 2007; SONATI; COSTA, 2008). No período pós concepção, as globinas são produzidas pelo saco vitelínico, fígado e baço; após o nascimento, ocorre a troca das hemoglobinas que passam a ser produzidas pela medula óssea. A Figura 2 ilustra a ontogenia das cadeias globínicas e os órgãos envolvidos nesse processo.

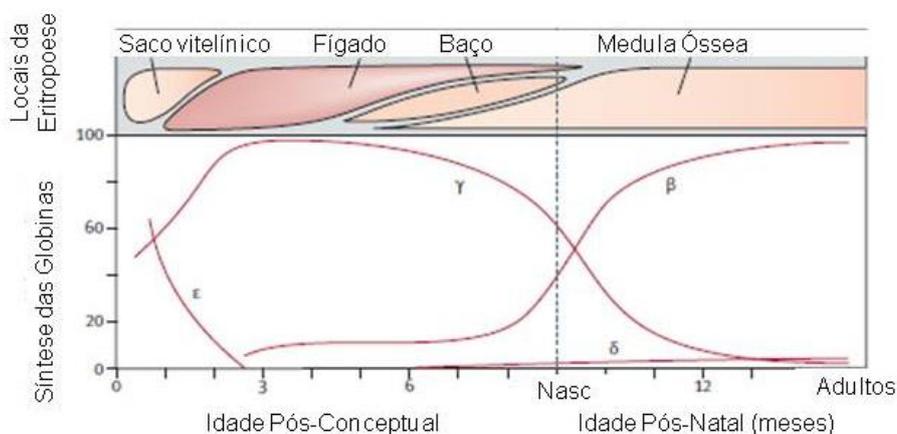


Figura 2: Órgãos e cadeias globínicas responsáveis pela eritropoese e síntese das hemoglobinas nos diferentes estágios do desenvolvimento (Modificado de HIGGS et al., 2012).

1.2 A Hemoglobina Fetal e sua relação com as beta hemoglobinopatias

A Hb F é produzida em altos níveis durante o período fetal, devido à expressão dos genes *HBG2* e *HBG1* e por apresentar alta afinidade ao oxigênio, o que é requerido nessa fase do desenvolvimento (MIYOSHI et al. 1988; MENZEL et al., 2007; XU et al., 2009).

Em adultos, a expressão desses genes é reduzida e a porcentagem de Hb F sintetizada varia entre 0% e 1%. Os níveis elevados de Hb F são conhecidos por melhorar as manifestações clínicas em indivíduos portadores de alterações de hemoglobinas, como anemia falciforme e beta talassemia. Quando os genes *HBG2* e *HBG1* são altamente expressos, a presença de níveis aumentados de Hb F nos eritrócitos pode compensar os produtos da beta globina alterada, o que reduz significativamente os sintomas clínicos da afecção herdada (WEATHERALL; CLEGG, 1981; STAMATOYANNOPOULOS et al., 1994; STEINBERG et al, 2001; PANDEY et al., 2012).

1.3 Talassemias

As talassemias são uma das afecções monogênicas mais comuns, afetando cerca de 7% da população mundial. Consistem em um grupo de alterações moleculares causadas pela redução parcial ou total da síntese de uma ou mais cadeias globínicas, resultando em menor produção de Hb A e anemia microcítica (tamanho reduzido dos eritrócitos) e hipocrômica (diminuição na quantidade de Hb) em graus variados (WEATHERALL; CLEGG, 1981; BUNN; FORGET, 1986; HIGGS, 1993; AYDINOK, 2012). A redução ou ausência de um tipo de cadeia globínica leva a um excesso relativo das cadeias cuja produção ocorre normalmente, sendo que essas cadeias em excesso se precipitam no precursor eritróide ocasionando lesões nas membranas e hemólise dos mesmos (NUSSBAUM et al., 2007; AYDINOK, 2012; HIGGS et al., 2012).

Os tipos de talassemias estão associados às cadeias globínicas cuja síntese está sendo afetada. As talassemias alfa e beta são as mais frequentes e apresentam manifestações variáveis e de considerável importância clínica para seus portadores. As primeiras são causadas, em sua grande maioria, por deleções gênicas, e as últimas principalmente por mutações pontuais na região promotora do gene *HBB*, em éxons e íntrons (NUSSBAUM et al., 2007; SONATI; COSTA, 2008).

1.3.1 Beta talassemia

As talassemias do tipo beta são decorrentes de mutações pontuais, pequenas deleções ou inserção de oligonucleotídeos, sendo que aproximadamente 230 mutações afetando o gene *HBB* foram descritas até o momento, com as maiores prevalências em populações oriundas da Região Mediterrânea e do Sudeste Asiático (HUISMAN et al., 1996; NUSSBAUM et al., 2007; CAO et al., 2011; AYDINOK, 2012; MUSOLLINO et al., 2012).

Estima-se que aproximadamente 1,5% da população mundial seja portadora da beta talassemia, o que representa 80 a 90 milhões de pessoas, com aproximadamente 60 mil indivíduos sintomáticos nascidos anualmente (GALANELLO; ORIGA, 2010; AYDINOK, 2012; HIGGS et al., 2012).

A beta talassemia apresenta heterogeneidade molecular e expressão fenotípica variável, existindo duas variantes alélicas: o alelo β^0 , associado à ausência da síntese de beta-globina, e o alelo β^+ , associado à síntese reduzida de tal cadeia (WEATHERALL; CLEGG, 2001). O diagnóstico é realizado a partir de dados clínicos, laboratoriais e moleculares, sendo que clinicamente a beta talassemia pode ser classificada em três grupos, de acordo com o fenótipo apresentado: beta talassemia maior, beta talassemia intermediária e beta talassemia menor (CAO et al., 1997; GALANELLO; ORIGA, 2010; AYDINOK, 2012; HIGGS et al., 2012).

A beta talassemia maior é resultado, geralmente, da homozigose dos alelos $\beta^0\beta^0$ ou de dupla heterozigose dos alelos ($\beta^+\beta^0$). Esses genótipos correspondem à forma mais grave da doença, e os portadores são dependentes de transfusões sanguíneas regulares. Apresentam ainda, sinais clínicos de anemia intensa, esplenomegalia e quando não recebem tratamento adequado, podem apresentar deformidades ósseas e alterações no crescimento, desenvolvimento e reprodução. As manifestações clínicas costumam aparecer durante o primeiro ano de vida, evidenciadas por menor aumento de peso, episódios de febre, diarreia, apatia, irritabilidade e palidez (WEATHERALL; CLEGG, 1981; GALANELLO; ORIGA, 2010; AYDINOK, 2012; HIGGS et al., 2012).

A beta talassemia intermediária é, geralmente, resultado da homozigose dos alelos $\beta^+\beta^+$ ou dupla heterozigose dos alelos ($\beta^+\beta^0$). Essa denominação reserva-se para casos sintomáticos que espontaneamente mantêm níveis de Hb entre 6 a 9 g/dL, mas não são dependentes de transfusões. A distinção entre talassemia maior ou intermediária é fundamental e exclusiva da prática clínica, pois define o tipo de tratamento que o

indivíduo deverá receber como suplementação com ácido fólico, transfusões e o monitoramento da anemia, sendo que o quadro clínico pode ser resultante de combinações moleculares distintas (ZAGO et al., 1983; GALANELLO; ORIGA, 2010; AYDINOK, 2012; HIGGS et al., 2012).

A beta talassemia menor, também chamada de traço talassêmico, é resultado da heterozigose dos alelos $\beta\beta^+$ ou $\beta\beta^0$, sendo clinicamente assintomática. Na maioria dos casos não há necessidade de tratamento, mesmo o portador apresentando microcitose, hipocromia e níveis de hemoglobina discretamente abaixo da normalidade. Apesar de ser detectada por exames laboratoriais específicos, é frequentemente confundida com anemia por carência de ferro (ZAGO et al., 2004; GALANELLO; ORIGA, 2010; AYDINOK, 2012; HIGGS et al., 2012).

Os portadores de beta talassemia podem apresentar elevação dos níveis de Hb A₂ e em alguns casos, aumento de Hb F, resultado da sobrevivência seletiva dos precursores eritróides, que sintetizam mais cadeias gama (THEIN, 2005; NUSSBAUM et al., 2007; GALANELLO; ORIGA, 2010).

O aumento nos níveis de Hb F, tem efeito benéfico no quadro clínico de homozigotos para a beta talassemia, não apenas por reduzir o desequilíbrio de cadeias do tipo alfa/não alfa, mas também por produzir aumento na síntese de Hb total. Entretanto, os portadores dessa afecção genética diferem em suas capacidades de sintetizar cadeias gama e nos níveis de Hb F (GALANELLO; CAO, 1998; THEIN, 2005). Assim, a maior expressão dos genes *HBG2* e *HBG1* tem relevância clínica no tratamento das doenças relacionadas à beta globina alterada (GALANELLO; CAO, 1998; THEIN, 2005; XU et al., 2009).

1.4 Mutações da beta talassemia

Algumas mutações de beta talassemia são específicas de determinados grupos étnicos, sendo que as predominantes na população da região Mediterrânea, que incluem italianos, espanhóis e portugueses, são comumente encontradas na população brasileira (BONINI-DOMINGOS, 2004). As mutações CD39 (C→T) e IVS-I-110 (G→A) estão relacionadas à maioria dos casos nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil (SONATI; COSTA, 2008; SILVEIRA et al., 2011), enquanto que na região Nordeste a mutação IVS-I-6 (T→C) é a mais frequente (ARAUJO et al., 2003; SILVEIRA et al., 2011).

Na Tabela 1 observa-se a representação das mutações mais frequentes na população brasileira, bem como sua população de origem e/ou fenótipo.

Tabela 1: Origem e fenótipo das mutações de beta talassemia.

Mutação	População de Origem	Fenótipo *
CD39 (C > T)	Mediterrânea	β^0
IVS-I-110 (G > A)	Mediterrânea	β^+
IVS-I-6 (T > C)	Mediterrânea	β^+
IVS-I-1 (G > A)	Mediterrânea; Asiático-Indiana	β^0

Legenda: β^0 = ausência completa de síntese de cadeia beta-globina; β^+ = produção residual de beta-globina; $\beta^{+/+}$ = redução discreta na produção de cadeia beta-globina.

* Galanello e Origa, 2010.

1.5 Sítio Polimórfico *XmnI* (-158 C→T)

O polimorfismo *XmnI*, decorrente de uma sequência variante na posição -158 (C→T) da região promotora do gene *HBG2*, altera o reconhecimento do sítio pela enzima *XmnI*. Esse polimorfismo é conhecido por influenciar a expressão dos genes *HBG2*, em condições de estresse hematopoético, como nos homozigotos para a beta talassemia, podendo elevar a taxa de produção de Hb F, o que gera uma melhora no fenótipo do indivíduo. Está presente em todos os grupos populacionais, com frequências variando de 32% a 35%, sendo responsável por cerca de um terço da variação genética nesse locus gênico (THEIN, 2004; CAO et al., 2011; ANSARI et al., 2013).

Os portadores de beta talassemia apresentam ampla variação nos níveis de Hb F, sendo que uma das possíveis razões para essa variação pode estar relacionada à presença desse polimorfismo (CAO; MOI, 2000; THEIN, 2004; NEISHABURY et al., 2012; ROY et al., 2012).

1.6 Haplótipo β -globina

O tipo de variabilidade mais comum no complexo gênico das globinas α ou β é aquele produzido por polimorfismos em determinadas sequências, sendo que o padrão de combinação desses sítios polimórficos para qualquer cromossomo é chamado de haplótipo (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; LONG et al., 1990).

Orkin e colaboradores (1982), buscando polimorfismos na família β -globina, em indivíduos beta talassêmicos de origem mediterrânea, revelaram seis sítios polimórficos que combinados levaram à nove padrões distintos de clivagem, que foram designados haplótipos de I a IX. A frequência individual de cada um deles variou de 1% a 47% nos cromossomos de talassêmicos de origem mediterrânea estudados, com o haplótipo I sendo o mais frequente, seguido pelos haplótipos II e V. Os menos frequentes foram os padrões de haplótipos IV e VIII. De acordo com esse estudo, os padrões polimórficos verificados em indivíduos beta talassêmicos não diferem, em frequência, dos padrões observados em indivíduos sem hemoglobinopatias de origem europeia. A classificação dos haplótipos verificados por Orkin e colaboradores (1982) para os indivíduos beta talassêmicos encontra-se representada na Figura 3.

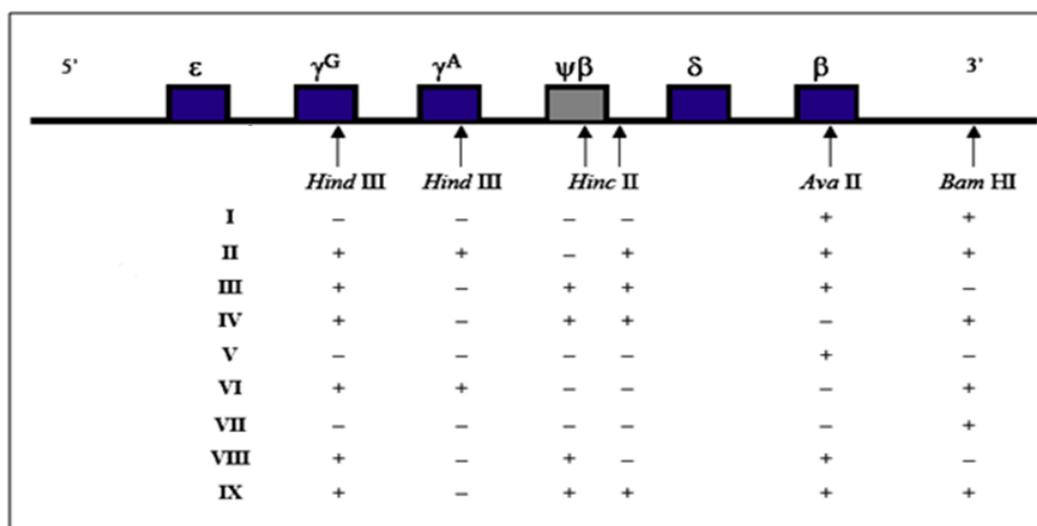


Figura 3: Sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β -globina, segundo Orkin et al. (1982).

Para indivíduos beta talassêmicos, a análise desses sítios polimórficos pode indicar possível associação entre o padrão de haplótipos e mutações que determinam a beta talassemia. Há relatos de associações entre o padrão de haplótipo II e a mutação CD39, o haplótipo I e a mutação IVS-I-110 e entre o haplótipo V e a mutação IVS-I-1, encontrado nas populações de negros, pardos e caucasóides do Estado de Pernambuco (BEZERRA, 2007).

1.7 Manifestações Clínicas na Beta talassemia Maior

Na beta talassemia maior os dois genes da β -globina estão alterados e a produção das cadeias da β -globina encontra-se afetada, resultando em anemia grave. Transfusões de sangue são necessárias ao longo da vida, no entanto, a carga de ferro no organismo aumenta, sendo necessário um tratamento com quelante de ferro para prevenir ou reverter complicações relacionadas a esse excesso (HASHEMIEH, 2012; PENNELL, 2013).

Em alguns países em desenvolvimento, em que recursos para o tratamento são escassos, ou os indivíduos não o recebem adequadamente ou foram mal transfundidos, o quadro clínico de talassemia maior é caracterizado por prejuízos no crescimento, palidez, icterícia, hepatoesplenomegalia, úlceras de perna e alterações esqueléticas, que incluem deformidades nos ossos longos das pernas e alterações craniofaciais típicas. Tais eventos clínicos não ocorrem nos indivíduos que recebem tratamento transfusional e terapia adequados (GALANELLO, ORIGA; 2010; HIGGS et al., 2012).

Pacientes mantidos em regime regular de transfusão desenvolvem, progressivamente, manifestações clínicas decorrentes da sobrecarga de ferro, como fibrose do fígado e disfunção cardíaca. Essa sobrecarga de ferro pode não ser somente devido ao intenso regime transfusional a que esse indivíduos são submetidos, e sim pela ação da hepcidina. Tendo em vista que neles, os baixos níveis de hepcidina fazem com que a absorção de ferro seja intensificada (GALANELLO, ORIGA; 2010; NEMETH; 2013).

Os níveis de ferro em doentes multitransfundidos podem ser avaliados por meio de vários métodos, sendo que a ferritina sérica é geralmente observada em correlação com os estoques de ferro no organismo. Apesar de um valor único nem sempre ser confiável, medidas seriadas de ferritina sérica continuam sendo um bom método e de fácil avaliação para sobrecarga de ferro e eficácia da terapia quelante. Nos últimos anos, técnicas de imagem de ressonância magnética para avaliar sobrecarga de ferro no fígado e coração foram introduzidas, como o parâmetro tempo 2^* de relaxamento ($T2^*$) que foi validado para mensurar a concentração de ferro no fígado e coração (GALANELLO, ORIGA; 2010).

A beta talassemia constitui uma das alterações de hemoglobinas mais comuns no Brasil, sendo originária dos países banhados pelo Mar Mediterrâneo, e sua presença está relacionada ao processo de colonização e fluxo migratório. Estima-se que de 1,5% a 3,0% da população mundial seja portadora da forma heterozigota e que seus portadores apresentem grande diversidade de expressão fenotípica e também variação nos níveis de Hb A₂ e Hb F (THEIN et al., 2009).

Acredita-se que a presença de diferentes mutações, que caracterizam os indivíduos beta talassêmicos estejam associadas à presença de diferentes haplótipos do grupamento da beta-globina e que esses padrões, bem como o polimorfismo *XmnI*, possam estar envolvidos no aumento dos níveis de Hb F e ainda estar relacionados a algumas manifestações clínicas, observadas nos indivíduos com beta talassemia homozigota.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

O objetivo geral do presente trabalho consistiu em investigar a presença do polimorfismo *XmnI* (-158 C→T) e o padrão de haplótipos da β -globina em beta talassêmicos heterozigotos, homozigotos e em indivíduos sem alterações de hemoglobinas.

2.2 Objetivos Específicos:

1. Avaliar a frequência do polimorfismo *XmnI* (-158 C→T);
2. Avaliar o padrão dos haplótipos da β -globina;
3. Estabelecer as possíveis relações entre a presença dos sítios polimórficos avaliados e o aumento da Hb F;
4. Relacionar a influência dos sítios polimórficos nas manifestações clínicas em beta talassêmicos homozigotos.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

A casuística desse estudo foi formada por 322 amostras de sangue periférico, colhidas com EDTA como anticoagulante, sendo dividida em três grupos. O primeiro grupo foi constituído de 150 indivíduos com beta talassemia heterozigota, sendo 92 mulheres e 58 homens, com média de idade de $37,35 \pm 18,90$. O segundo grupo, composto por 22 indivíduos com beta talassemia homozigota, sendo 10 mulheres e 12 homens, com média de $31,87 \pm 15$ e outro grupo composto por 150 de indivíduos sem hemoglobinopatias, 53 mulheres e 97 homens, com média de idade de $39,54 \pm 11,73$. As amostras foram coletadas de indivíduos da região Sudeste do Brasil; todas as coletas e o armazenamento das amostras seguiram os padrões éticos e recomendações da Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) 196/96 e complementares. Os objetivos estão incluídos em amplo projeto, com aprovação pelo Comitê de Ética local, sob o n° 09673412.3.0000.5466.

Dos 22 indivíduos beta talassêmicos homozigotos, 12 (54,5%) foram classificados clinicamente como beta talassêmicos maiores e 10 (45,5%) como beta talassêmicos intermediários.

3.2 Metodologia

As amostras foram submetidas aos testes clássicos para diagnóstico de hemoglobinopatias, quantificação das frações globínicas por HPLC e análise molecular. A Figura 4 ilustra o fluxograma de realização desses testes, durante o desenvolvimento do projeto.

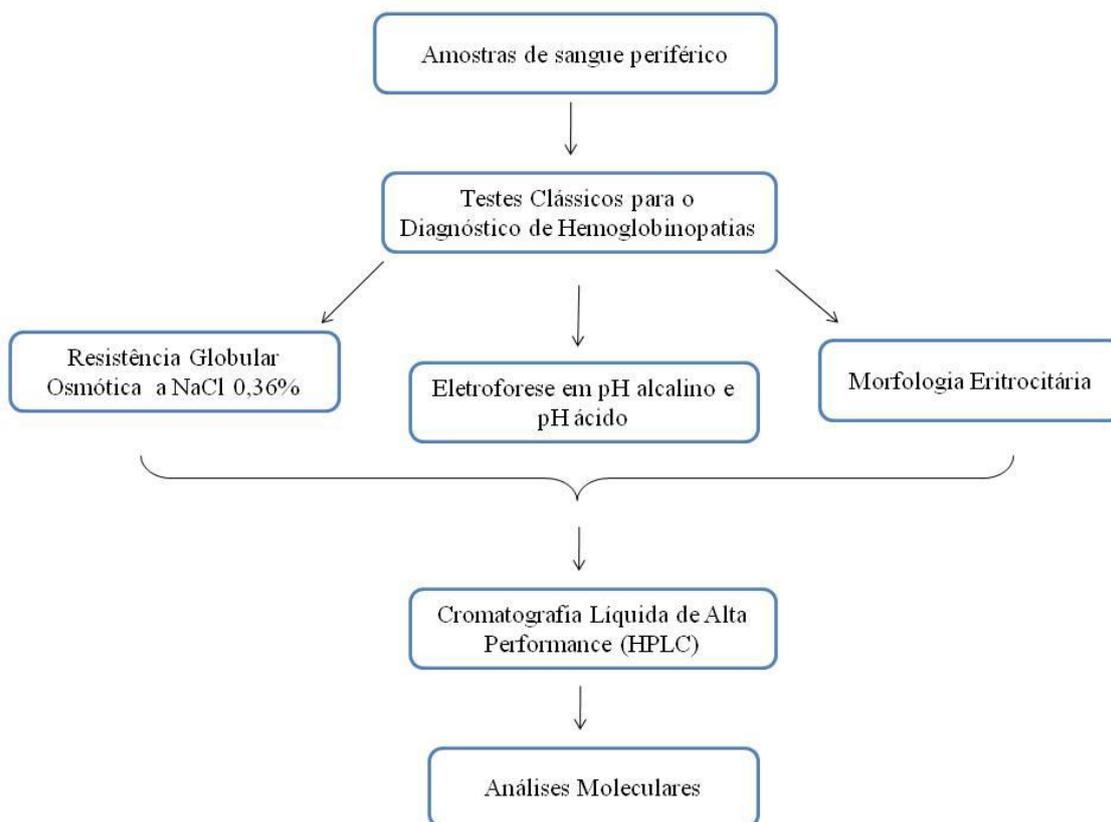


Figura 4: Fluxograma com os testes da triagem básica e complementares, para a obtenção do perfil de hemoglobinas, aos quais as amostras foram submetidas.

3.2.1 Testes Clássicos para o Diagnóstico de Hemoglobinopatias

Resistência globular osmótica eritrocitária em solução de NaCl a 0,36% (SILVESTRONI; BIANCO, 1975)

Princípio:

Técnica utilizada para detectar talassemias do tipo beta, principalmente na forma heterozigota, pois nesses casos os eritrócitos microcíticos são mais resistentes à hemólise, nesta solução. A resistência globular não é específica para beta talassemias heterozigota, pois resultados positivos são encontrados também em anemias carenciais e em outras hemoglobinopatias, como nos homozigotos para Hb C. No entanto, cerca de 97% dos portadores de beta talassemia heterozigota apresentam positividade para esse teste.

Reagentes:

Solução estoque - NaCl a 10% - pH 7,4

- NaCl	9,0 g
- Na ₂ HPO ₄	1,36 g
- NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,28 g
- Água destilada q.s.p	100 mL

Solução trabalho

- NaCl 10%	36 mL
- Água destilada q.s.p	1000 mL

Procedimento:

Em tubo de hemólise colocou-se 2 mL de solução de NaCl a 0,36% e 10 µL de sangue total, agitando por inversão, suavemente. A leitura foi feita após 10 minutos.

Interpretação:

O tubo de hemólise com a amostra na solução de NaCl a 0,36% foi colocado a 2,0 cm de uma folha branca com linhas negras. O teste foi interpretado como positivo quando não se visualizou as linhas negras, pois a resistência aumentada à hemólise do eritrócito tornou a amostra opaca. Em amostras com resistência normal à hemólise, visualizou-se facilmente as linhas através da solução.

Análise da morfologia eritrocitária (BONINI-DOMINGOS, 2006)

Os esfregaços sanguíneos foram analisados ao microscópio óptico, em relação ao tamanho, forma e quantidade de Hb nos eritrócitos. Os resultados foram expressos da seguinte maneira, segundo padronização do LHGDH para cada um dos parâmetros avaliados.

- células normais: (N)
- alterações discretas: (+)
- alterações moderadas: (++)
- alterações acentuadas: (+++)

Eletrforese de hemoglobinas em pH alcalino (MARENGO; ROWE, 1965)

Princípio:

Esta técnica foi utilizada para qualificar e quantificar as Hb normais e grande parte das Hb anormais com mobilidades eletroforéticas diferentes das Hb normais.

Reagentes:

Tampão TRIS-EDTA-BORATO (TEB), pH 8,6

- Tris hidroximetil aminometano	10,2 g
- Ácido etilenodiaminotetracético	0,6 g
- Ácido Bórico	3,2 g
- Água destilada q.s.p	1000 mL

Conservado em geladeira

Corante Ponceau

- Ponceau S	0,5 g
- Ácido tricloroacético	5,0 g
- Água destilada q.s.p	100 mL

Solução descorante:

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

Procedimento:

- As fitas de acetato de celulose foram embebidas no tampão TEB por 15 minutos, no mínimo e seis horas, no máximo.

- Após serem secas em folhas de papel absorvente, as fitas foram colocadas na cuba de eletrforese, que continha também o tampão TEB, conectando-as aos compartimentos eletrolíticos por tecido absorvente (pano multiuso).

- A solução de Hb foi aplicada a 1,0 cm da extremidade da fita em contato com o pólo negativo.

- A corrida foi realizada à 300 volts por 30 minutos.

- As frações foram analisadas, primeiramente, sem coloração e posteriormente coradas com Ponceau. Para corá-las, as fitas foram colocadas no corante por cinco minutos e, depois, em solução descorante por 30 minutos.

Eletoforese de hemoglobinas em pH ácido (VELLA, 1968)

Princípio:

Técnica utilizada para diferenciar alguns tipos de Hb que migram em posições semelhantes na eletroforese em pH alcalino e caracterização de Hb Fetal.

Reagentes:

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

- Na ₂ HPO ₄	2,02 g
- NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	7,66 g
- Água destilada q.s.p	1000 mL

Conservar em geladeira

Gel de Ágar-Fosfato

- Ágar-agar	500 mg
- Tampão fosfato pH 6,2	25 mL

Procedimento:

- Os componentes do gel de ágar-fosfato foram adicionados a um erlenmeyer de 250 mL e levados ao forno micro-ondas até completa dissolução, tomando cuidado para a mistura não ferver.

- Foram pipetados 5,0 mL do gel em lâminas de microscópio que polimerizaram a temperatura ambiente. As amostras foram aplicadas na porção média da lâmina, inserindo o aplicador com cuidado para não partir totalmente o gel.

- Para conexão do gel com os compartimentos eletrolíticos foi utilizado tecido absorvente (pano multiuso).

- A corrida foi realizada à 100 volts por 30 minutos.

- As frações foram analisadas sem corar ou coradas com Ponceau.

Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (BONINI-DOMINGOS, 2006)

Princípio:

O equipamento utilizado foi o VARIANT (BIO-RAD) com Kit de análise Beta Talassemia Heterozigota. O equipamento consiste na cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, no qual duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição, com controles de gradientes pré-programados, passam pela coluna detectando as alterações de absorvância a 415 nm. O filtro secundário de 690 nm corrige a linha de base para efeitos provocados pela mistura de tampões com forças iônicas diferentes. As mudanças na absorvância são monitoradas e exibidas como um cromatograma da absorvância versus tempo. Os dados de análise provenientes do detector são processados por um integrador embutido e impressos no relatório da amostra de acordo com o tempo de retenção. O tempo de retenção é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da Hb. Cada Hb tem um tempo de retenção característico. No final da análise da amostra, uma cópia do cromatograma e os dados do relatório são automaticamente impressos.

Procedimento:

Para o Kit Beta Talassemia Heterozigota:

Em um tubo de 1,5 mL, fornecido pelo fabricante, foram misturados 5 µL de sangue total com 1,0 mL de solução hemolisante fornecida no kit de análise. Após a hemólise total, as amostras foram acondicionadas nos recipientes adequados e alojadas no equipamento para realização dos procedimentos de leitura e análise das frações.

Interpretação:

A quantificação das diferentes frações de Hb em uma amostra foi realizada a partir dos valores percentuais e de tempo de retenção fornecidos pela calibração específica, e emitidos em modelo próprio que incluiu valores numéricos e perfil cromatográfico. Aos valores de Hb A₀ obtidos pela HPLC foram incluídas as subfrações de Hb A glicosilada e Hb A acetilada, denominadas P2 e P3 respectivamente, identificadas separadamente pelo aparelho. Os valores de Hb A₂ considerados normais foram de 2,5 a 3,5% e os de Hb F até 1,3%, previamente estabelecidos e fornecidos pelo fabricante.

3.2.2 Análises Moleculares

Para as análises moleculares objetivou-se a preparação das amostras, conforme segue:

Extração de DNA de sangue periférico por meio de fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989 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 nucléicos 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 nucléicos 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
- MgCl ₂ 5 mM	0,5 mL
- Triton 1% 100x	1,0 mL
- Água ultrapura autoclavada	100 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. Adicionar 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 8281 RCF (força centrífuga relativa).
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 8281 RCF
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 8281 RCF.
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 8281 RCF.
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 38.416 RCF.
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 38.416 RCF.
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.

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.

Amplificação

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica *in vitro*, para amplificação de DNA. A reação, catalisada pela enzima *Taq* polimerase, utilizou

primers que se hibridizaram em fitas opostas de regiões específicas do genoma e flanquearam a sequência a ser amplificada (SAIKI, 1992).

PCR-Alelo Específica (PCR-AE)

Essa técnica foi utilizada para realizar a genotipagem dos indivíduos beta talassêmicos. Foram rastreadas quatro mutações: CD-39, IVS-I-6, IVS-I-1 e IVS-I-110, que são as mais comuns para beta talassêmicos na região Sudeste.

A PCR-AE ocorreu em dois tubos; em um deles foi acrescentado, além dos produtos base, dois *primers* (um sense e outro antisense), que permitiram a verificação da funcionalidade da PCR e um *primer* com sequência complementar à posição normal no genoma. No outro tubo foram acrescentados os mesmos dois primers iniciais e um primer com sequência complementar à região da mutação analisada. Dessa forma foi possível verificar o genótipo do indivíduo, na dependência da verificação do produto amplificado: quando presente apenas no primeiro tubo demonstrou um indivíduo normal; quando a amplificação positiva for verificada no tubo 1 e 2, caracterizou um indivíduo heterozigoto para a mutação analisada; e ainda, se o material amplificado foi verificado apenas no tubo 2, evidenciou um indivíduo homozigoto para a mutação em analisada (BERTHOLO, 2005). Seguem os protocolos de amplificação para as quatro mutações avaliadas, e na sequência de cada um deles um esquema dos possíveis produtos de restrição da PCR-AE, representado pelas Figuras 5, 6, 7 e 8.

Protocolo de amplificação para CD39

Mix I - Alelo Normal (W)			Mix II - Alelo Mutante (M)		
Mix	Concentração	Volume	Mix	Concentração	Volume
H ₂ O	----	8,0 µL	H ₂ O	----	8,0 µL
Tampão sem MgCl ₂	10 X	2,5 µL	Tampão sem MgCl ₂	10 X	2,5 µL
MgCl ₂	50mM	0,75 µL	MgCl ₂	50mM	0,75 µL
DMSO puro	100%	1,0 µL	DMSO puro	100%	1,0 µL
dNTPs	5 mM	4,0 µL	dNTPs	5 mM	4,0 µL
Primer B5a	2 uM	2,5 µL	Primer B5a	2 uM	2,5 µL
Primer B5b	2 uM	2,5 µL	Primer B5b	2 uM	2,5 µL
Primer PS39W	10 uM	2,5 µL	Primer PS39M	10 uM	2,5 µL
Taq (5U) Invitrogen	5 U/µL	0,25 µL	Taq (5U) Invitrogen	5 U/µL	0,25 µL
DNA molde	(100ng/µl)	1,0 µL	DNA molde	(100ng/µl)	1,0 µL

Sequência de primers

Controle interno da reação:

B5a: 5' GGC TGT CAT CAC TTA GAC CTC A 3'

B5b: 5'AGA AGG GGA AAG AAA ACA TCA A 3'

Tamanho do fragmento amplificado: **659 pb**

Primers específicos:

PS39W: 5' GAC TCA AAG AAC CTC TG 3'

PS39M: 5' GAC TCA AAG AAC CTC TA 3'

Tamanho do fragmento amplificado: **439 pb****Ciclos****Temp**
°C**Tempo****Repetições**

95°C

7´ } }

1 X

94°C

50´´ } }

32 X

54°C

50´´ } }

32 X

72°C

50´´ } }

32 X

72°C

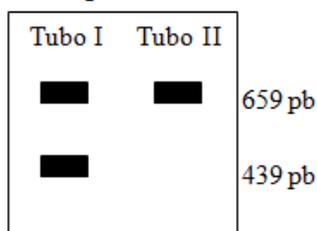
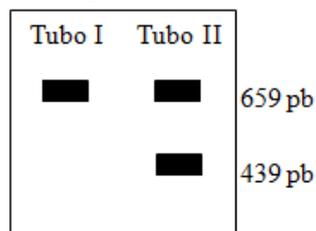
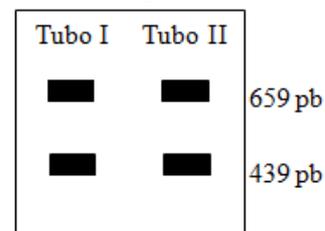
7´ } }

1 X

4°C

∞

1 X

Homozigoto Normal**Homozigoto Mutante****Heterozigoto****Figura 5:** Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-AE para a mutação CD39. pb = pares de bases.

Protocolo de amplificação para IVS-I-110

Mix I - Alelo Normal (W)			Mix II - Alelo Mutante (M)		
Mix	Concentração	Volume	Mix	Concentração	Volume
H ₂ O	----	8,0 µL	H ₂ O	----	8,0 µL
Tampão sem MgCl ₂	10 X	2,5 µL	Tampão sem MgCl ₂	10 X	2,5 µL
MgCl ₂	50mM	0,75 µL	MgCl ₂	50mM	0,75 µL
DMSO puro	100%	1,0 µL	DMSO puro	100%	1,0 µL
dNTPs	5 mM	4,0 µL	dNTPs	5 mM	4,0 µL
Primer B5a	2 uM	2,5 µL	Primer B5a	2 uM	2,5 µL
Primer B5b	2 uM	2,5 µL	Primer B5b	2 uM	2,5 µL
Primer IVSII10W	10 uM	2,5 µL	Primer IVSII10M	10 uM	2,5 µL
Taq (5U) Invitrogen	5 U/µL	0,25 µL	Taq (5U) Invitrogen	5 U/µL	0,25 µL
DNA molde	(100ng/µl)	1,0 µL	DNA molde	(100ng/µl)	1,0 µL

Sequência de primers		Ciclos		
Controle interno da reação:		Temp °C	3.2.3 Tempo	3.2.4 Repetições
B5a: 5' GGC TGT CAT CAC TTA GAC CTC A 3'		95°C	7' }	1 X
B5b: 5' AGA AGG GGA AAG AAA ACA TCA A 3'		94°C	50'' }	
Tamanho do fragmento amplificado: 659 pb		54°C	50'' }	32 X
Primers específicos:		72°C	60'' }	
IVSIIW: 5' GTG ACC TTG ATA CCA AC 3'		72°C	7' }	1 X
IVSIIM: 5' GTG ACC TTG ATA CCA AA 3'		4°C	∞	
Tamanho do fragmento amplificado: 393 pb				

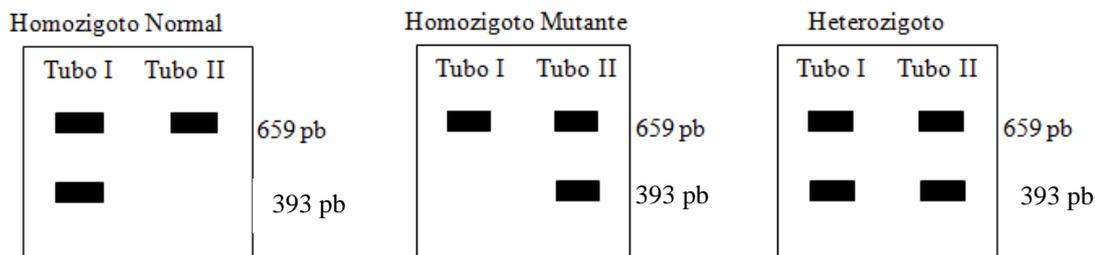


Figura 6: Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-AE para a mutação IVS-I-110. pb = pares de bases.

Protocolo de amplificação para IVS-I-6**Mix I - Alelo Normal (W)****Mix II - Alelo Mutante (M)**

Mix	Concentração	Volume	Mix	Concentração	Volume
H ₂ O	----	7,85 µL	H ₂ O	----	7,85 µL
Tampão sem MgCl ₂	10 X	2,5 µL	Tampão sem MgCl ₂	10 X	2,5 µL
MgCl ₂	50mM	0,75 µL	MgCl ₂	50mM	0,75 µL
DMSO 100%	100%	1,0 µL	DMSO 100%	100%	1,0 µL
dNTPs	5 mM	4,0 µL	dNTPs	5 mM	4,0 µL
Primer B5a	2 uM	2,5 µL	Primer B5a	2 uM	2,5 µL
Primer B5b	2 uM	2,5 µL	Primer B5b	2 uM	2,5 µL
Primer IVSI6W	10 uM	2,5 µL	Primer IVSI6M	10 uM	2,5 µL
Taq (5U) Invitrogen	5 U/µL	0,4 µL	Taq (5U) Invitrogen	5 U/µL	0,4 µL
DNA molde	(100ng/µl)	1,0 µL	DNA molde	(100ng/µl)	1,0 µL

Sequência de primers

Controle interno da reação:

B5a: 5' GGC TGT CAT CAC TTA GAC CTC A 3'

B5b: 5' AGA AGG GGA AAG AAA ACA TCA A 3'

Tamanho do fragmento amplificado: **659 pb**

Primers específicos:

IVSI6W: 5' GTC TTG TAA CCT TGA TA 3'

IVSI6M: 5' GTC TTG TAA CCT TGA TG 3'

Tamanho do fragmento amplificado: **273 pb**

Ciclos

Temp °C	3.2.5	Tempo	3.2.6	Repetições
95°C	7'	}		1 X
94°C	50''			
54°C	50''	}		32 X
72°C	50''			
72°C	7'	}		1 X
4°C	∞			

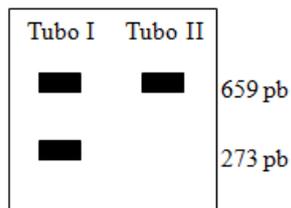
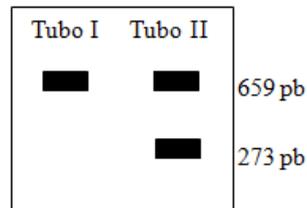
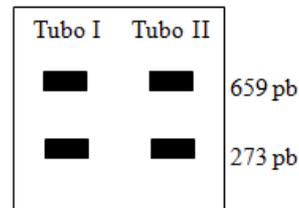
Homozigoto Normal**Homozigoto Mutante****Heterozigoto**

Figura 7: Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-AE para a mutação IVS-I-6. pb = pares de bases.

Protocolo de amplificação de IVS-I-1**Mix I - Alelo Normal (W)**

Mix	Concentração	Volume
H ₂ O	----	8,0 µL
Tampão sem MgCl ₂	10 X	2,5 µL
MgCl ₂	50mM	0,75 µL
DMSO 100%	100%	1,0 µL
dNTPs	5 mM	4,0 µL
Primer B5a	2 uM	2,5 µL
Primer B5b	2 uM	2,5 µL
Primer IVSI1W	10 uM	2,5 µL
Taq (5U) Invitrogen	5 U/µL	0,25 µL
DNA molde	(100ng/µl)	1,0 µL

Mix II - Alelo Mutante (M)

Mix	Concentração	Volume
H ₂ O	----	8,0 µL
Tampão sem MgCl ₂	10 X	2,5 µL
MgCl ₂	50mM	0,75 µL
DMSO 100%	100%	1,0 µL
dNTPs	5 mM	4,0 µL
Primer B5a	2 uM	2,5 µL
Primer B5b	2 uM	2,5 µL
Primer IVSI1M	10 uM	2,5 µL
Taq (5U) Invitrogen	5 U/µL	0,25 µL
DNA molde	(100ng/µl)	1,0 µL

Sequência de primers

Controle interno da reação:

B5a: 5' GGC TGT CAT CAC TTA GAC CTC A 3'

B5b: 5' AGA AGG GGA AAG AAA ACA TCA A 3'

Tamanho do fragmento amplificado: **659 pb**

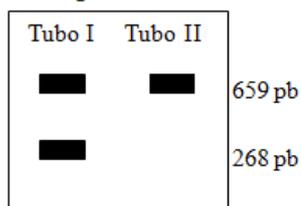
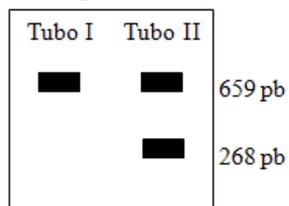
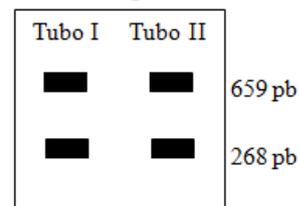
Primers específicos:

IVSI1W: 5' GTG ACC TTG ATA CCA AC 3'

IVSI1M: 5' GTG ACC TTG ATA CCA AA 3'

Tamanho do fragmento amplificado: **268 pb****Ciclos**

Temp °C	Tempo	Repetições	
95°C	7'	}	1 X
94°C	50''		}
54°C	50''		
72°C	60''		
72°C	7'	}	1 X
4°C	∞		

Homozigoto Normal**Homozigoto Mutante****Heterozigoto****Figura 8:** Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-AE para a mutação IVS-I-1. pb = pares de bases.

Estratégia Molecular para o Sequenciamento Genômico das mutações de Beta Talassemia

Para os pacientes portadores de beta talassemia homocigota que não tiveram o genótipo definido pelas análises moleculares por meio de PCR-AE, foi necessário elaborar uma estratégia de sequenciamento genômico para a definição da mutação presente. Foram sintetizados três pares de oligonucleotídeos para rastrear mutações em parte da região promotora da β -globina, éxons, íntrons e regiões não-traduzidas (UTRs). Utilizamos o programa *Primer 3 Input* (<http://frodo.wi.mit.edu/>) para a definição das sequências específicas, que foram posteriormente blastadas para verificação do sítio de reconhecimento no genoma, por meio da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A Tabela 2 apresenta as sequências dos três pares de oligonucleotídeos sintetizados e o tamanho do fragmento amplificado.

Tabela 2: Sequências e tamanho dos fragmentos amplificados com os pares de oligonucleotídeos sintetizados para o sequenciamento genômico e definição das mutações de beta talassemia.

Par de oligonucleotídeos	Sequência dos oligonucleotídeos	Fragmento amplificado
HBB seq 1	F 5' ACTCCTAAGCCAGTGCCAGA 3' R 5' CACGTGCAGCTTGTCACAG 3'	640 pb
HBB seq 2	F 5' TCTGTCCACTCCTGATGCTG 3' R 5' GCAAATTACCCTGATTTGGTC 3'	663 pb
HBB seq 3	F 5' TTGGAATATATGTGTGCTTATTTGC 3' R 5' GACCTCCCACATTCCTTTT 3'	829 pb

Legenda: F = *forward*; R = *reverse*; pb = pares de base.

Após a padronização das reações de amplificação das sequências de interesse, as amostras foram preparadas para posterior sequenciamento genômico. O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6. Os DNA-moldes (25 ng) foram marcados utilizando-se 2,5 pmol de cada *primer* (seis *primers* para cada indivíduo) e 3 μ L do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* em um volume final de 10 μ L. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C

por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi, desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection* v 1.0.1 com os parâmetros *Dye Set* “Z”; *Mobility File* “DT3100POP6{BDv3}v1.mob”; *BioLIMS Project* “3100_Project1”; *Run Module 1* “StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100”; e *Analysis Module 1* “BC-3100SR_Seq_FASTA.saz”.

PCR-RFLP

Mutações podem criar ou eliminar sítios polimórficos, que são pontos de reconhecimento de enzimas de restrição. Nos cromossomos de um organismo, esses sítios de restrição específicos podem estar presentes ou ausentes (+ ou -), resultando em polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP). Na técnica de PCR-RFLP, o DNA genômico depois de amplificado é digerido com uma enzima de restrição específica que pode reconhecer um sítio polimórfico que foi criado, ou não reconhecer o sítio de clivagem que foi eliminado por uma mutação, resultando em fragmentos de tamanhos diferenciados (GRIFFITHS et al., 2002).

Análise do polimorfismo *XmnI* (SUTTON et al., 1989) e dos haplótipos da β -globina (ORKIN et al., 1982)

A determinação do polimorfismo *XmnI* e dos haplótipos da β -globina foi realizada pela técnica de PCR-RFLP. Para a análise dos padrões de combinação foram avaliados seis sítios polimórficos, de acordo com Orkin et al. (1982), sendo os sítios e suas enzimas de restrição, respectivamente: γ^G -*HindIII*, γ^A -*HindIII*, $\psi\beta$ -*HincII*, 3' $\psi\beta$ -

HincII, β - *Ava II* e 3' *BamH I*. As sequências dos *primers* para análise dos polimorfismos do *cluster* da β -globina foram descritas por Sutton, Bouhassira, Nagel (1989) e Miranda e colaboradores (1997) e estão listadas abaixo (Tabela 3), bem como a composição das reações para amplificação das regiões polimórficas (Tabela 4), das condições das reações (Tabela 5) e dos tamanhos dos produtos amplificados (Tabela 6).

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

<i>Sítio</i>	<i>Primer</i>	Sequência do primer (5' – 3')	Região
<i>Xmn</i> I	**H0	AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	5' γ^G
	**H1	AGGAGCTTATTGATAACCTCAG	
<i>Hind</i> III	**H2	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	γ^G
	**H3	TCATGTGCACACTCCACACTT	
<i>Hind</i> III	**H3	AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	γ^A
	**H4	TAAATGAGGAGCATGCACACAC	
<i>Hinc</i> II	**H5	GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	$\Psi\beta$
	**H6	ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	
<i>Hinc</i> II	**H7	TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	3' $\Psi\beta$
	**H8	GGACCCTAACTGATATAACTA	
<i>Ava</i> II	*P1	TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG	β
	*P5	TCATTCGTCTGTTTCCCATTC	
<i>Bam</i> HI	**SF1	GCCCACATCACCAAGGCAAT	3' β
	**SF2	ATCTCACACATCCGTAGAGC	

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

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

Tabela 4: 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>Bam</i> HI 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
<i>Primer</i> 5' (10 μ M)	-	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Primer</i> 3' (10 μ M)	-	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Primer</i> 5' (25 μ M)	0,25	-	-	-	-
<i>Primer</i> 3' (25 μ M)	0,25	-	-	-	-
<i>Taq</i> Polimerase (5U/ μ L)	0,125	0,25	0,25	0,15	0,15
DNA (100 ng/ μ L)	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 5: Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas da família β -globina.

Região	Desnaturação Inicial		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão Final	
	T (°C)	Tempo	35 ciclos							
			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'

Tabela 6: Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição.

Primer	Enzima	Região	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 9 exemplifica a imagem do gel de agarose para um dos sítios polimórficos analisados.

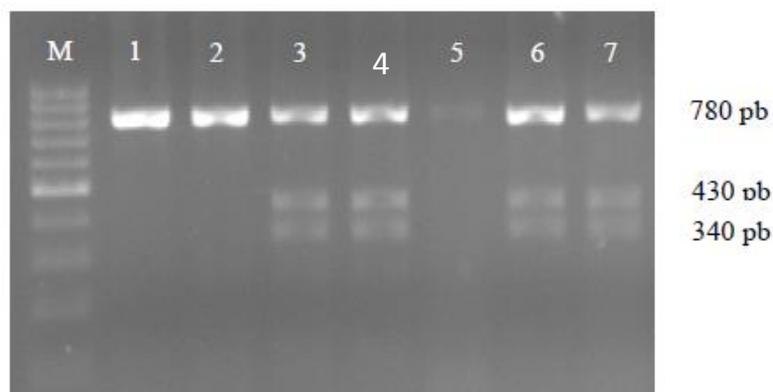


Figura 9: Foto do gel de agarose 1,5% mostrando os fragmentos de DNA obtidos após a digestão dos fragmentos para a região da γ^G , utilizando a enzima *Hind* III. M= Marcador molecular 100 pares de base. Linhas 1 e 2 representam indivíduos com ausência do sítio de restrição. Linhas 3, 4, 6 e 7 representam 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.

3.3 Análise Estatística

Utilizando o software STATISTICA 8.0, inicialmente avaliou-se a normalidade (*Shapiro Wilk*), e a homogeneidade das variâncias (*Levene*). Para os níveis de Hb F em relação às mutações, foram utilizados os testes *Kruskal Wallis* complementado por *Dunn*, pois os dados eram não paramétricos. O mesmo teste foi utilizado para analisar os níveis de Hb F em relação aos padrões de haplótipos. A possível relação entre o polimorfismo *XmnI* com os níveis de Hb F, foi analisada utilizando-se o teste Mann-Whitney, já que para a presença ou ausência do polimorfismo e frequências deste polimorfismo utilizou-se o teste do Qui-Quadrado.

A fim de avaliar a distribuição das frequências dos haplótipos e o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos para os três grupos estudados, foi utilizado o software Haploview 4.2, que analisa os polimorfismos par a par, de acordo com sua heterozigosidade. Para todas as análises realizadas foi avaliado o polimorfismo *XmnI*, juntamente com os outros seis sítios polimórficos, que juntos geraram o padrão de haplótipos. O sítio polimórfico *XmnI* foi incluído nas análises devido à sua influência nos níveis de Hb F, sendo importante para os resultados desse estudo. Tendo em vista que para o último sítio polimórfico avaliado (na região 3' β), todos os indivíduos foram homocigotos mutantes (+/+), o mesmo foi excluído das análises.

O desequilíbrio de ligação entre os polimorfismo foi medido, e os blocos, apresentaram cores distintas, de acordo com o coeficiente de desequilíbrio de ligação (D') e a probabilidade dos polimorfismo estarem ligados (LOD), como mostra a Tabela 7. Sendo que um LOD com valores igual a 2, significa que a hipótese dos marcadores estarem ligados é 100 vezes (10^2) mais provável do que a hipótese de eles não estarem ligados (SILVA, 2002; CASTRO, 2008).

Tabela 7: Esquema de cores para os blocos de haplótipos, utilizando o software Haploview 4.2.

	$D' < 1$	$D' = 1$
LOD < 2	Branco	Azul
LOD \geq 2	Tons de vermelho	Vermelho brilhante

D' : coeficiente de desequilíbrio de ligação

LOD: representa a hipótese dos marcadores estarem ligados (utiliza-se a função logarítmica na base 10).

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da Amostra

4.1.1 Presença das mutações de beta talassemia

Para a caracterização das amostras do estudo, em relação à presença de mutações de beta talassemia, foram analisadas quatro mutações, sendo elas CD39 e IVS-I-1 (β^0) e IVS-I-110 e IVS-I-6 (β^+), que são as mais frequentes no Brasil. A mutação IVS-I-1 não foi observada em nenhum indivíduo dos grupos estudados. Para os indivíduos com beta talassemia heterozigota foi observado 62% da mutação CD39; 25% da IVS-I-110; 7% de mutações não identificadas e 6% da mutação IVS-I-6, como representado na Figura 10. Para os indivíduos com beta talassemia homozigota, a mutação mais observada foi a IVS-I-6 com 22% do total, seguida por 15% da CD39 e 13% para a mutação IVS-I-110 (Figura 11). Os 50% restantes não foram genotipados por PCR-AE, sendo submetidos então ao sequenciamento (Tabela 8).

Tabela 8: Resultado do sequenciamento dos indivíduos com beta talassemia homozigota.

Região do gene β -globina	Mutação	Fenótipo	Grupos Étnicos
Promotora	-29 (A>G)	β^+	Negros americanos e Chineses
	-88 (C>T)	β^+	Negros americanos e Indianos
Éxon	CD15 (TGG>TGA)	β^0	Portugueses e Japoneses
	CD24 (GGT>GGA)	β^+	Negros americanos e Chineses
Íntron	IVS-I-5 (G>A)	β^+	Mediterrâneos
5'- UTR	Cap+20 (C>T)	Desconhecido	Búlgaros

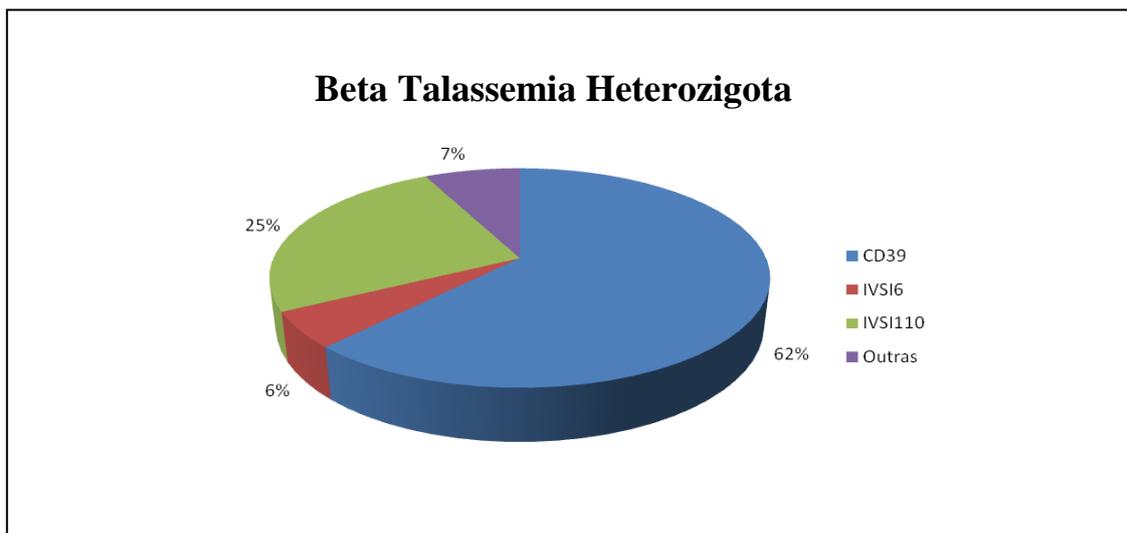


Figura 10: Gráfico ilustrando a distribuição das mutações observadas nos indivíduos com beta talassemia heterozigota.

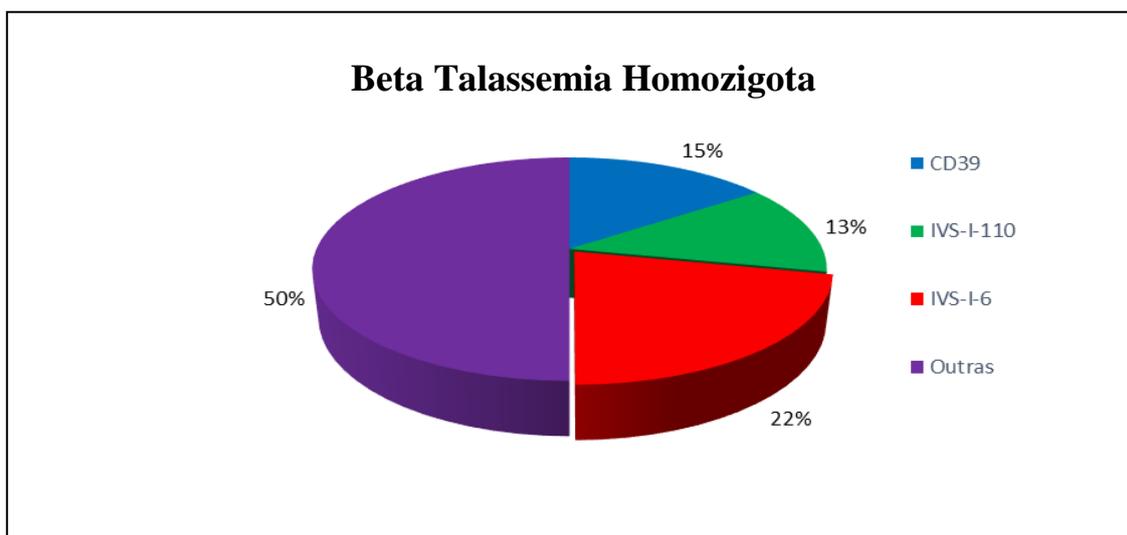


Figura 11: Gráfico ilustrando a distribuição das mutações observadas nos indivíduos com beta talassemia homozigota. (Outras mutações: -29, IVS-I-5, CD24, cap+20, e sequenciamento).

4.1.2 Níveis de hemoglobina fetal (Hb F) em relação às mutações de beta talassemia

Para a beta talassemia heterozigota, os níveis de Hb F separados por mutação herdada mostraram que os indivíduos que apresentaram a mutação CD39 (a mais observada nesse grupo) possuem níveis mais elevados dessa Hb, em relação à mutação IVS-I-110 e a IVS-I-6. Os resultados da análise estatística mostraram diferenças para os níveis de Hb F entre as mutações não identificadas (outras) e a mutação IVS-I-110. Os indivíduos com beta talassemia homozigota não apresentaram diferença em relação aos níveis de Hb F e as mutações herdadas, tendo em vista que estes são submetidos a um regime de hipertransfusão, apresentando assim, baixos níveis de Hb F já que esses valores refletem o perfil dos indivíduos doadores (Tabela 9).

Tabela 9: Valores de hemoglobina fetal observados nas mutações de beta talassemia analisadas.

Níveis de Hb F (%) nas mutações de Beta talassemia*					
Mutação	CD39	IVS-I-110	IVS-I-6	Outras	p
Heterozigotos	1,3 ± 1,45	0,8 ± 1,40^a	0,9 ± 0,85	3,7 ± 3,80^b	<0,05
Homozigotos	3,2 ± 21,2	2,6 ± 5,6	5,75 ± 12,8	6,2 ± 6,3	0,743

* Valores de Hb F representados pela Mediana ± Amplitude interquartis.

a e b: diferenças significativas entre os dois grupos de mutações. Teste Kruskal-Wallis.

4.2 Polimorfismo *XmnI*

A presença do sítio polimórfico *XmnI* foi observada em todos os grupos avaliados. Nos indivíduos beta talassêmicos heterozigotos foram encontrados dois indivíduos (1%) com ambos os alelos mutados (+/+) para o polimorfismo em questão; 54 indivíduos (36%) com um dos alelos mutados (+/-) e 94 (63%) sem a presença do polimorfismo (-/-). Para os indivíduos beta talassêmicos homozigotos, quatro indivíduos (18%) apresentaram um dos alelos mutados e 18 indivíduos (82%) não apresentaram o polimorfismo. Em relação ao grupo de indivíduos sem hemoglobinopatias (grupo controle) seis indivíduos (4%) apresentaram os dois alelos mutados, 58 (39%) apresentaram um dos alelos mutados e 86 indivíduos (57%) não apresentaram o polimorfismo, como mostra a Tabela 10.

Tabela 10: Frequências do polimorfismo *XmnI* (n e em %) observadas nos três grupos estudados.

Grupo	Frequência do Polimorfismo <i>XmnI</i> (n e %)		
	+/+	+/-	-/-
β Tal Heterozigota	2 (1%)	54 (36%)	94 (63%)
β Tal Homozigota	-	4 (18%)	18 (82%)
Controle	6 (4%)	58 (39%)	86 (57%)

(+): presença do polimorfismo *XmnI*. (-): ausência do polimorfismo *XmnI*.

Em relação às frequências alélicas, foi observado nos indivíduos com beta talassemia heterozigota 0,20 para o alelo (+) e 0,80 para o alelo (-); para os indivíduos com beta talassemia homozigota foi observado 0,10 para o alelo (+) e 0,90 para o (-). E para o grupo sem alterações de hemoglobinas 0,23 para o (+) e 0,77 para o (-).

Avaliando a presença (+/+ e +/-) ou a ausência (-/-) do polimorfismo *XmnI* e sua relação com os níveis de Hb F, observou-se diferença apenas para os indivíduos com beta talassemia heterozigota ($p=0,007$) como observado na Tabela 11.

Tabela 11: Valores de hemoglobina fetal observados em relação ao polimorfismo *XmnI*, em indivíduos beta talassêmicos heterozigotos, homozigotos e indivíduos sem hemoglobinopatias.

	Polimorfismo <i>XmnI</i> e níveis de Hb F*			p
	+/+	+/-	-/-	
Beta Heterozigota	1,80 ± 3,35^a		1,05 ± 1,30^b	0,007
Beta Homozigota	5,05 ± 22,70		2,80 ± 6,70	0,27
Grupo Controle	0,00 ± 0,60		0,2 ± 0,50	0,17

* Valores de Hb F representados pela Mediana ± Amplitude interquartis

(+): presença do polimorfismo *XmnI*. (-): ausência do polimorfismo *XmnI*.

a e b: diferença significativa nos níveis de Hb F em relação ao polimorfismo *XmnI*. Teste Mann Whitney.

4.3 Haplótipos da Beta Globina

A análise dos haplótipos da β -globina foi utilizada para identificação da origem desses alelos nos grupos de estudo. Para a determinação dos haplótipos foram analisados seis sítios polimórficos, o que levou a identificação de padrões típicos e atípicos, tanto para indivíduos com beta talassemia heterozigota e homozigota, quanto para indivíduos sem hemoglobinopatias. Para a caracterização dos haplótipos, foram analisados 300 alelos (150 indivíduos) com beta talassemia heterozigota, 44 alelos (22 indivíduos) com beta talassemia homozigota e outros 300 alelos (150 indivíduos) sem alterações de hemoglobinas (grupo controle).

Em relação aos haplótipos, foram observados seis padrões típicos (todos estiveram presentes nos três grupos estudados), sendo eles os haplótipos I, II, IV, VI, VII e IX. Os padrões II e VII foram os mais observados nos indivíduos portadores de beta talassemia heterozigota; já para os indivíduos com beta talassemia homozigota e nos sem alterações de hemoglobinas, os padrões I e VII foram os mais observados. Esses padrões típicos somaram 82%, 91% e 98% do total dos haplótipos para os indivíduos beta talassêmicos heterozigotos, homozigotos e controle, respectivamente.

Dos padrões típicos, não foram observados em nenhum dos grupos os haplótipos III, V e VIII. A Tabela 12 mostra as frequências observadas para cada haplótipo nos três grupos avaliados.

Para os beta talassêmicos heterozigotos foram observados 34 alelos (12%) do haplótipo I, 73 alelos (24%) do haplótipo II, 10 alelos (3%) do IV, cinco alelos (2%) do VI, 96 alelos (32%) do VII e 28 (9%) do IX. Esses padrões típicos totalizaram 246 alelos (82% do total), sendo que os 18% restantes foram classificados como padrões atípicos de haplótipos, como na Figura 12.

Para os indivíduos com beta talassemia homozigota foram observados 13 alelos (30%) do haplótipo I, três alelos (7%) do haplótipo II, dois (4%) do IV, quatro (9%) do VI, 17 (39%) do VII e somente um alelo (2%) do haplótipo IX. Esses 40 alelos corresponderam a aproximadamente 91% do total e os 9% restantes são referentes aos padrões atípicos (Figura 13).

Indivíduos do grupo sem alterações de hemoglobinas apresentaram 93 alelos (31%) do haplótipo I, 45 alelos (15%) do haplótipo II, 41 alelos (14%) do IV, seis (2%) do VI, 85 (28%) do VII e 24 (8%) do IX, totalizando 294 alelos (98%). Nesse grupo

foram observados apenas seis alelos (2%) com padrões atípicos. Desse modo, destaca-se que os padrões típicos mais observados foram o I, II e o VII, sendo o último observado com alta frequência nos três grupos (Figura 14).

Tabela 12: Frequência dos haplótipos (em %) típicos observados em beta talassêmicos heterozigotos, homozigotos e em indivíduos sem hemoglobinopatias (grupo controle).

Haplótipos Típicos							
Haplótipos	I	II	IV	VI	VII	IX	Total*
Beta Hetero	11,34%	24,33%	3,33%	1,67%	32%	9,33%	82%
Beta Homo	29,55%	6,88%	4,55%	9,10%	38,64%	2,28%	91%
Controle	31%	15%	13,67%	2%	28,33%	8%	98%

*: total de haplótipos típicos observados em cada grupo.

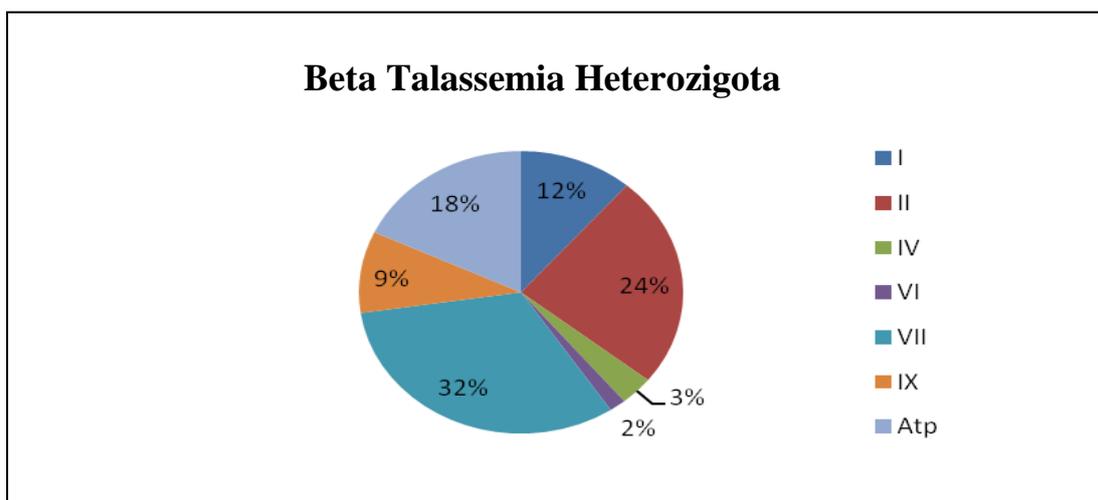


Figura 12: Padrões de haplótipos observados nos indivíduos com beta talassemia heterozigota.

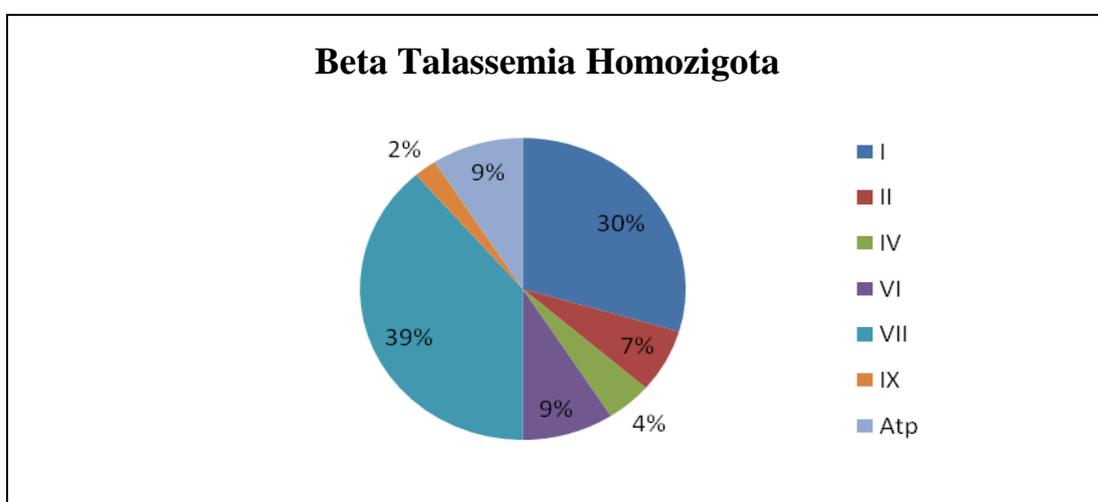


Figura 13: Padrões de haplótipos observados nos indivíduos com beta talassemia homozigota.

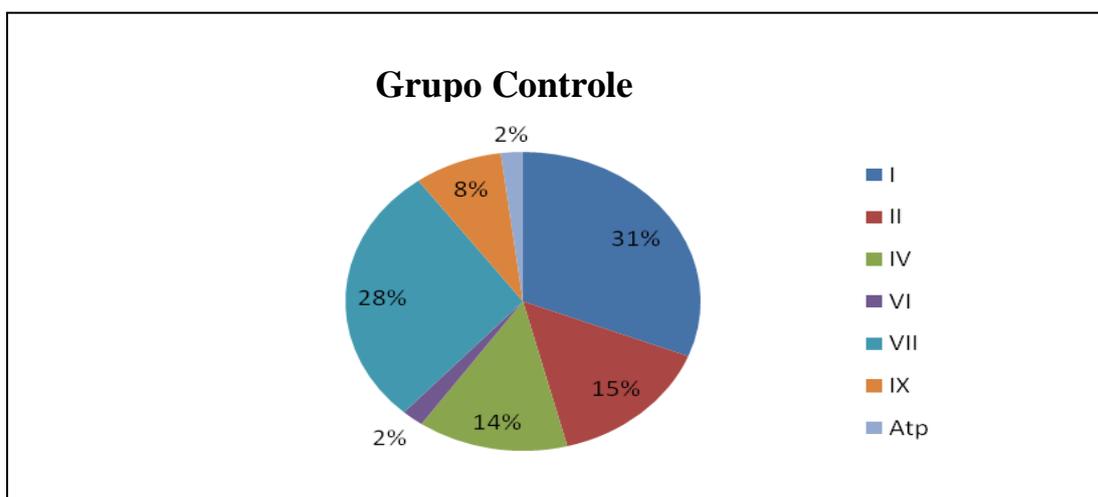


Figura 14: Padrões de haplótipos observados nos indivíduos sem alterações de hemoglobinas.

Em relação aos níveis de Hb F nos haplótipos, foi observada diferença significativa somente no grupo de indivíduos beta talassêmicos heterozigotos, sendo ela entre os haplótipo I e haplótipo IV. Para os indivíduos com beta talassemia homozigota e o grupo sem hemoglobinopatias, não foi observada diferença significativa, dados esses observados na Tabela 13.

Nos indivíduos com beta talassemia homozigota, os níveis de Hb F podem refletir o padrão hemoglobínico dos doadores de sangue, já que esses indivíduos estão constantemente em regime transfusional; desse modo os níveis observados podem não refletir verdadeiramente o perfil dos indivíduos com a afecção.

Tabela 13: Níveis de Hb fetal (Hb F) em relação aos haplótipos típicos observados em indivíduos com beta talassemia heterozigota, homozigota e indivíduos sem hemoglobinopatias.

Níveis de Hb F (Haplótipos Típicos) *							
Haplótipos	I	II	IV	VI	VII	IX	p
Beta Hetero	0,65±1,00^a	1,2 ±1,20	3,10 ±4,10^b	0,80±0,10	1,10±1,60	1,15±1,25	0,007
Beta Homo	3,00±4,10	1,90±14,20	-	5,25±12,10	3,00±5,50	-	0,27
Controle	0±0,5	0±0	0±0,5	0±0	0,10±0,5	0±0,5	0,29

*Os dados foram expressos em Mediana ± Amplitude Interquartis

a e b: mostra a diferença dos níveis de Hb F entre os padrões de haplótipos. Teste Kruskal- Wallis, post hoc *Dunn*.

Os indivíduos com o padrão de haplótipo IV para beta talassemia heterozigota apresentaram mutações não identificadas (um indivíduo), IVS-I-110 (um indivíduo), IVS-I-6 (um indivíduo) e a mutação CD39 (10 indivíduos).

Foram observados ainda, 15 padrões atípicos de haplótipos (Tabela 14) para os indivíduos com beta talassemia heterozigota, dois padrões atípicos (dentro desses 15 observados) para os indivíduos com beta talassemia homozigota e seis para os indivíduos do grupo controle. Para os haplótipos atípicos encontrados, não houve diferença significativa em relação ao aumento nos níveis de Hb F.

Tabela 14: Padrões de haplótipos atípicos, observados nos grupos de estudo.

Haplótipo β -globina	<i>Hind III</i>		<i>Hinc II</i>		<i>Ava II</i>	<i>Bam HI</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	+	-	-	-	+	+
Atp 14	+	-	+	-	+	+
Atp 15	-	+	+	+	+	+

Legenda: Atp – Atípico; (+) presença do sítio polimórfico; (-) ausência do sítio polimórfico.

Em relação aos portadores de beta talassemia heterozigota, a mutação CD39 foi observada em todas as combinações de haplótipos encontradas (inclusive nos padrões atípicos), apresentando frequência de 34% para o haplótipo II e 27% para o haplótipo VII. A mutação IVS-I-110 foi observada com frequência de 23% na presença do haplótipo I e 37% para o haplótipo VII; para a mutação IVS-I-6 foi verificada a frequência de 44% para o haplótipos VII. Mutações de beta talassemia não identificadas apresentaram frequências de 20% para haplótipo I e 50% para o VII, como mostra a Figura 15.

Para os portadores de beta talassemia homozigota, a mutação CD39 foi novamente observada em todas as combinações de haplótipos encontradas (incluindo padrões atípicos), porém os mais frequentes foram, com 15% o haplótipo I e com 36% o haplótipo VII. A mutação IVS-I-110 foi observada com frequência de 40% na presença dos haplótipos I e 50% para o haplótipo VII e por fim, para a mutação IVS-I-6 foi verificada a frequência de 33% para os haplótipos I e VII. Essas frequências detalhadas encontram-se apresentadas na Figura 16.

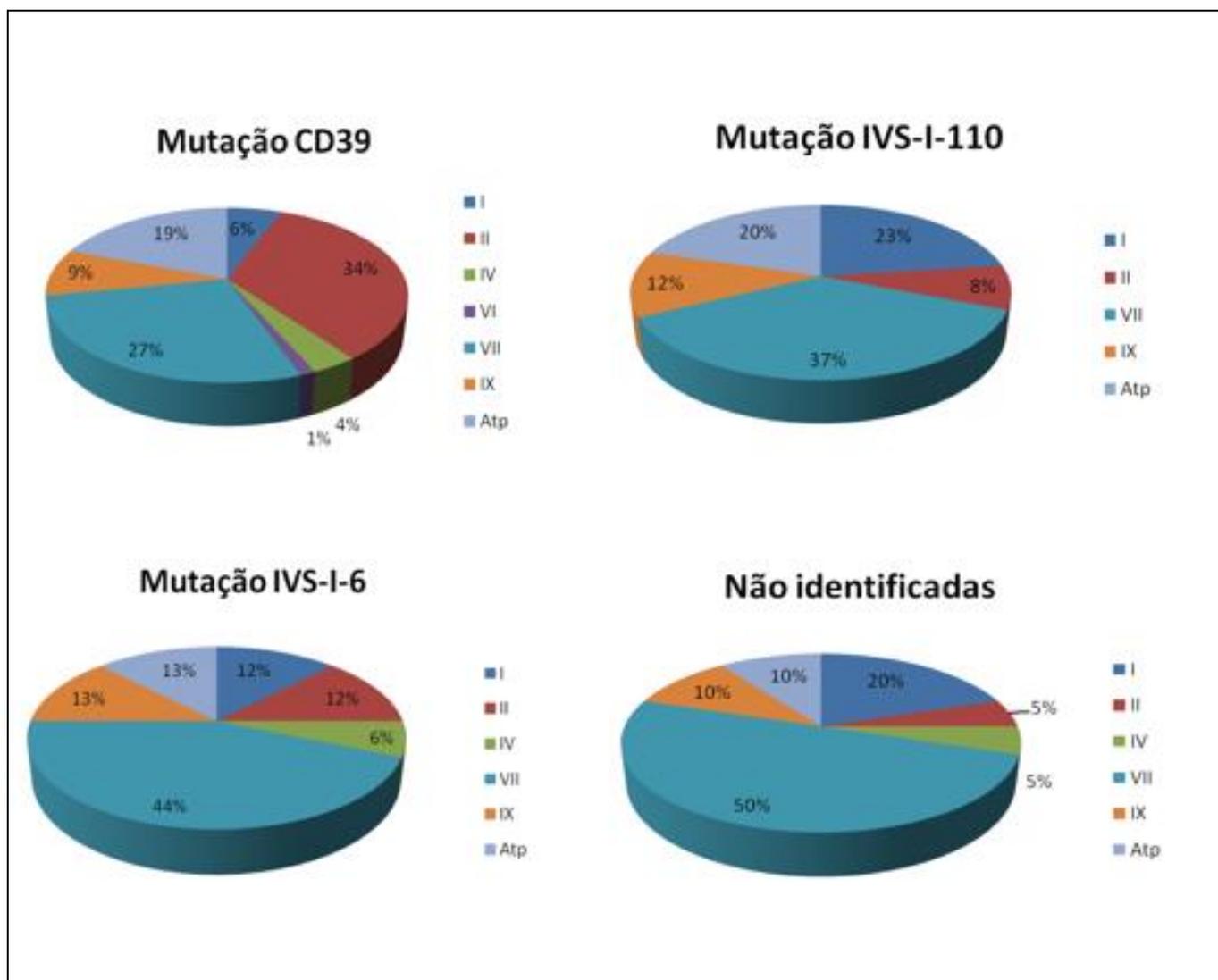


Figura 15: Frequência dos haplótipos β -globina em indivíduos beta talassêmicos heterozigotos separados pela mutação herdada.

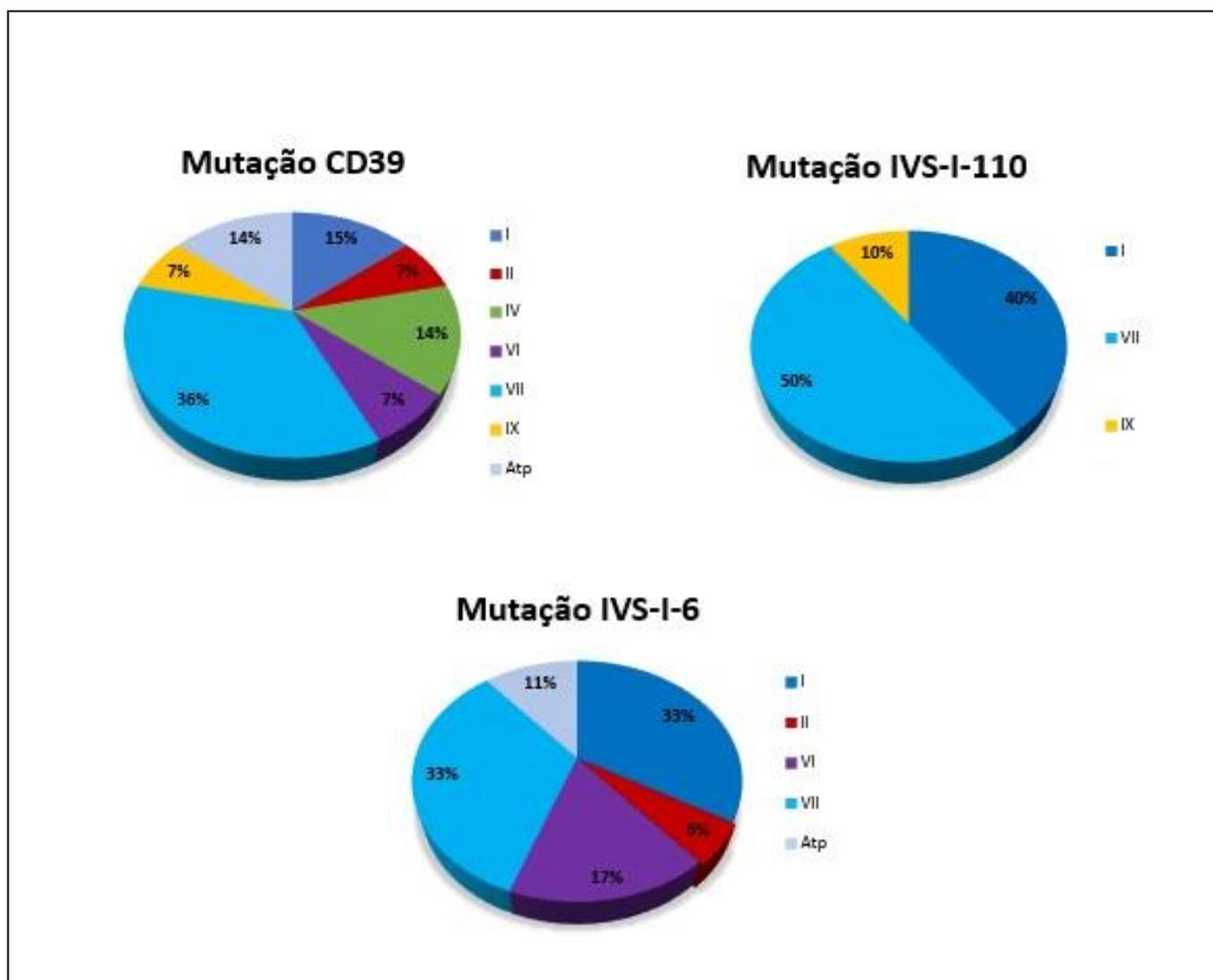


Figura 16: Frequência dos haplótipos β -globina em indivíduos beta talassêmicos homocigotos separados pela mutaçao herdada.

4.3.1 Frequência dos haplótipos e desequilíbrio de ligação (Haploview 4.2)

Para confirmar as frequências dos haplótipos nos grupos estudados, foi utilizado também o software Haploview 4.2, sendo que foram mostrados apenas os haplótipos com frequência igual ou superior a 1%. A primeira análise incluiu todos os indivíduos com beta talassemia (heterozigota e homozigota) comparados aos indivíduos sem alterações de hemoglobinas (grupo controle). Foram identificados os seis padrões típicos já observados e cinco padrões atípicos, sendo que um desses padrões não havia sido classificado anteriormente, denominado, portanto de atípico 16*. As frequências observadas foram: haplótipo VII (30,3%), I (16%), II (15,4%), IX (11%), IV (4,4%), atípico 1 (2,7%), atípico 6 (2,6%), haplótipo VI (2,4%), atípico 11 (1,9%), atípico 16* (1,1%) e atípico 3 (1%).

Comparando os indivíduos com beta talassemia heterozigota em relação ao grupo controle, foram identificados os seis padrões típicos e seis padrões atípicos, entre eles o atípico 16*. O haplótipo VII apresentou frequência de 30,3%, o II (16%), I (15,4%), IX (11%), VI (4,4%), atípico 1 (2,7%), haplótipo IV (2,6%), atípico 11 (2,4%), atípico 4 (1,9%), atípico 3 (1,4%), atípico 16* (1,1%) e atípico 2 (1%).

Nos indivíduos com beta talassemia homozigota em relação ao grupo controle, foram observados seis padrões típicos de haplótipos e seis padrões atípicos. Foram identificados: haplótipo VII (29,1%), I (19,9%), IX (13,7%), atípico 11 (5,7%), haplótipo II (4,7%), atípico 6 (4,5%), haplótipo IV (4,2%), atípico 16* (3,3%), atípico 1 (3%), atípico 9 (2,8%), haplótipo VI (2,8%) e atípico 15 (1,7%).

Comparando-se os indivíduos com beta talassemia heterozigota em relação aos indivíduos com beta talassemia homozigota, os seis padrões típicos foram observados e também seis padrões atípicos. As frequências foram, haplótipo VII (30,3%), II (16%), I (15,4%), IX (11%), VI (4,4%), atípico 1 (2,7%), haplótipo IV (2,6%), atípico 11 (2,4%), atípico 4 (1,9%), atípico 3 (1,4%), atípico 16* (1,1%) e atípico 2 (1%).

Para cada uma das avaliações obtivemos informação sobre quais padrões de haplótipos apresentaram diferença significativa na frequência. Na primeira análise, os indivíduos sem alterações de hemoglobinas (grupo controle) diferiram significativamente dos indivíduos com beta talassemia (heterozigota e homozigota) em relação ao haplótipo II e aos haplótipos atípicos 3 e 6, sendo suas frequências, respectivamente: 20,6%/9,4% para o haplótipo II; 1,3%/4,1% para o atípico 6 e 1,8%/0,1% para o atípico 3. Na segunda análise, os indivíduos do grupo controle

mostraram diferença em relação aos indivíduos com beta talassemia heterozigota para o haplótipo II e os haplótipos atípicos 3 e 6, com frequências de 23%/9,8% para o haplótipo II; 1,3%/4,4% para o atípico 6 e 2%/0,1% para o atípico 3. Para os indivíduos do grupo controle em relação aos beta talassêmicos homozigotos, foi observada diferença entre o haplótipo VI e o haplótipo atípico 16*, com 11,2%/1,5% para o haplótipo típico e 15,6%/1,5% para o atípico. E por fim, ao analisarmos os indivíduos com beta talassemia heterozigota em relação aos com beta talassemia homozigota foi observada diferença significativa entre os haplótipos II e VI e no haplótipo atípico 16*, com frequências de 9%/22,6% para o haplótipo II; 11,6%/1,8% para o haplótipo VI e 13%/0,2% para o atípico 16*.

Para mensurar o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismo, nos indivíduos sem hemoglobinopatias (controle) em relação aos indivíduos com beta talassemia (heterozigota e homozigota), maiores valores de D' foram obtidos entre os polimorfismo nas regiões da $5'\gamma^G/\gamma^G$ e também entre os polimorfismo nas regiões da $\gamma^G/\Psi\beta$ ($D'=0,93$), o que sugere um forte desequilíbrio de ligação entre eles. Os menores valores de D' foram observados entre os polimorfismos nas regiões do $\Psi\beta/\beta$ ($D'=0,01$) e entre os polimorfismos nas regiões da $5'\gamma^G/\beta$ ($D'=0,05$), sugerindo um equilíbrio de ligação entre os sítios polimórficos. Esses valores para cada par de polimorfismos avaliados pode ser observado na Figura 17.

Para as análises entre o grupo controle e indivíduos com beta talassemia heterozigota, o maior valor para D' foi observado entre os polimorfismo nas regiões da $\gamma^G/\Psi\beta$ ($D'=0,93$), e das regiões da $5'\gamma^G/\gamma^G$ ($D'=0,92$). Como na análise anterior, os menores valores de D' ($D'=0,09$ e $D'=0,03$) foram observados respectivamente entre os polimorfismos $\Psi\beta/\beta$ e entre $5'\gamma^G/\beta$. Como mostra a Figura 18.

Analisando os indivíduos do grupo controle relacionados aos indivíduos com beta talassemia homozigota, os maiores valores de D' foram observados entre os polimorfismos nas regiões $5'\gamma^G/\gamma^G$ e $\gamma^G/\Psi\beta$ ($D'=0,96$). Já os menores valores de D' , foram observados entre os polimorfismos nas regiões γ^A/β e $3'\Psi\beta/\beta$, com $D'=0,08$ e $D'=0,06$ respectivamente (Figura 19).

Para as análises entre os grupos com beta talassemia heterozigota em relação aos indivíduos com beta talassemia homozigota, o maior valor para D' foi observado entre os polimorfismo nas regiões da $5'\gamma^G/\gamma^A$ ($D'=1,0$). O menor valor de D' foi observado entre os polimorfismos das regiões $5'\gamma^G/\beta$ com $D'=0,02$. Como mostra a Figura 20.

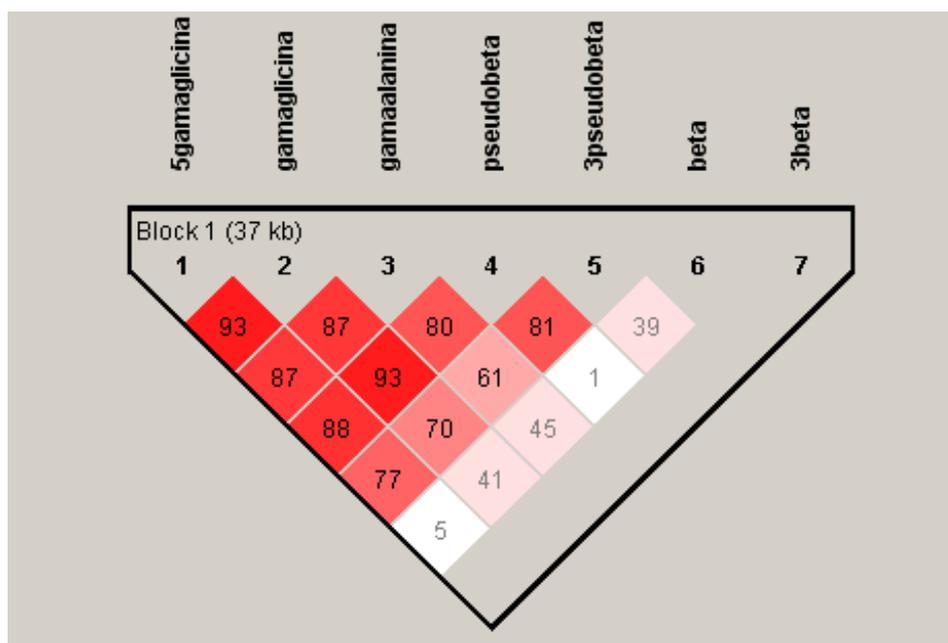


Figura 17: Esquema representativo de desequilíbrio de ligação para o grupo controle versus talassêmicos. Os blocos com tonalidades mais claras, próximas a cor branca, representam menor desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos.

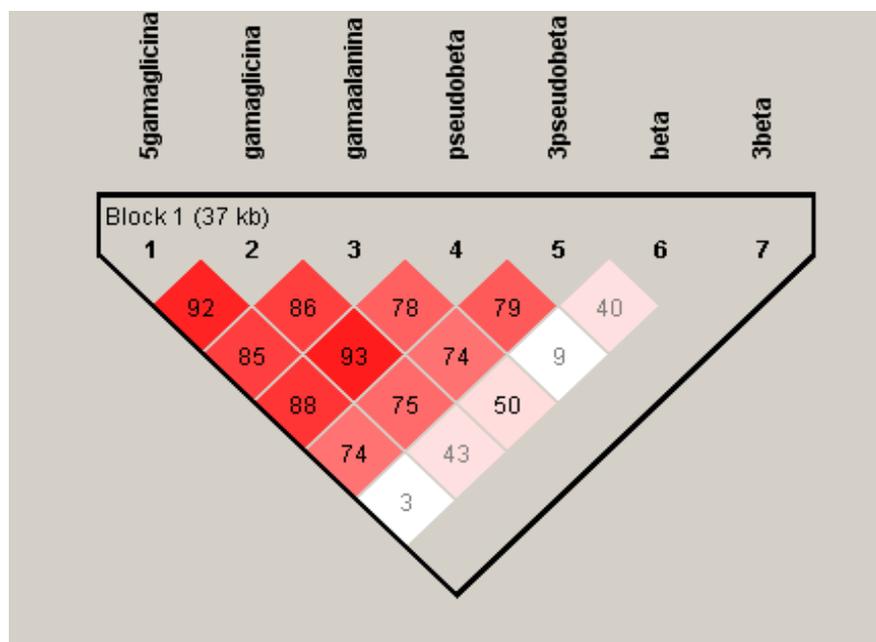


Figura 18: Esquema representativo de desequilíbrio de ligação para o grupo controle versus beta talassemia heterozigota. Os blocos com tonalidades mais claras, próximas a cor branca, representam menor desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos.

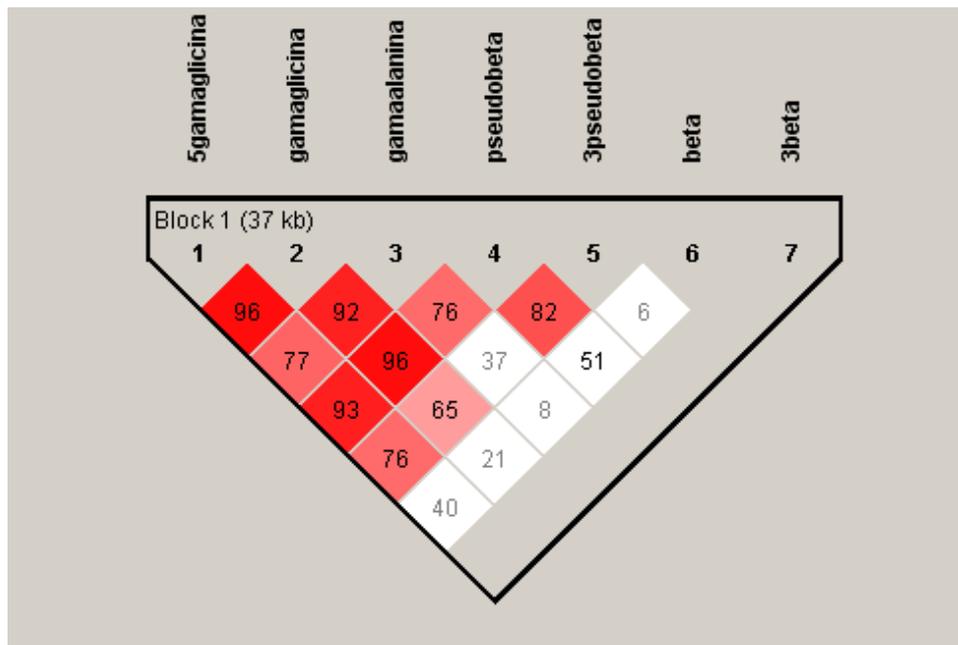


Figura 19: Esquema representativo de desequilíbrio de ligação para o grupo controle versus beta talassemia homozigota. Os blocos com tonalidades mais claras, próximas a cor branca, representam menor desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos.

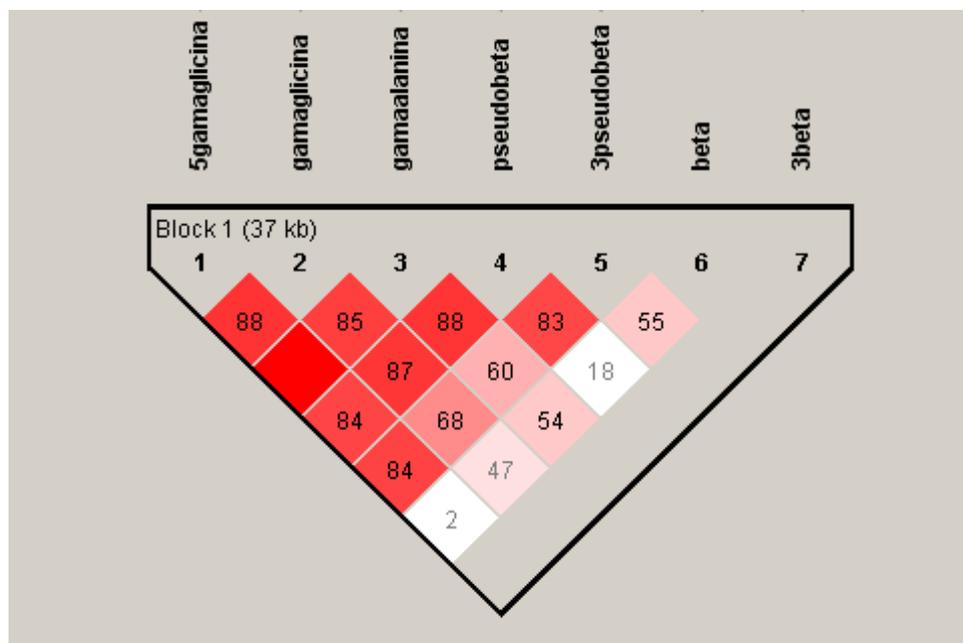


Figura 20: Esquema representativo de desequilíbrio de ligação para os beta talassêmicos heterozigotos versus os homozigotos. Os blocos com tonalidades mais claras, próximas a cor branca, representam menor desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos.

4.4 Manifestações Clínicas

Um dos problemas que acomete os indivíduos beta talassêmicos homozigotos é a sobrecarga de ferro (devido ao intenso regime transfusional e e ainda os mecanismos de ação da hepcidina) em órgãos específicos, como no fígado e coração. Foi observada sobrecarga de ferro no fígado nos 22 indivíduos, sendo a média de T2* de 1,91ms, tendo em vista que os valores de normalidade devem ser superiores a 11,4ms. Já em relação à sobrecarga de ferro no coração, esta foi observada em apenas um indivíduo (relatado no prontuário com sobrecarga de ferro leve). A média de T2* para a sobrecarga de ferro no coração, para esses indivíduos foi de 32,30ms, com índice de normalidade considerado superior a 20ms (PENNELL, 2013).

Outras manifestações clínicas também foram observadas nesses indivíduos, como: úlcera em membros inferiores (4 indivíduos), osteoporose (3 indivíduos), sequelas de face (4), esplenectomia (5), feto apresentando cardiopatias (1), esplenomegalia (2), crise de dores e torácicas abdominais (1) e até aborto espontâneo (1), totalizando 13 indivíduos como ilustra a Figura 21. Os outros nove indivíduos não apresentaram manifestações clínicas relevantes.

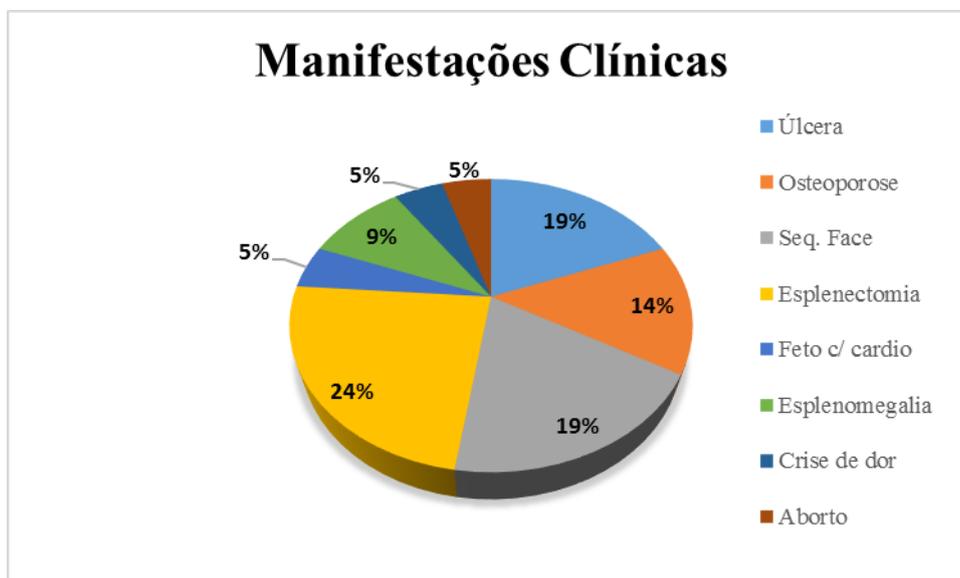


Figura 21: Manifestações clínicas em indivíduos com beta talassemia homozigota.

Apesar de termos conhecimento das manifestações clínicas desses indivíduos, não foi possível relacioná-las ao polimorfismo XmnI e aos haplótipos da beta globina, já que essas manifestações podem ser condições da própria afecção.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Foram genotipadas as quatro mutações de beta talassemia mais frequentes para a região Sudeste (CD39, IVS-I-1, IVS-I-110 e IVS-I-6). Para os indivíduos com beta talassemia heterozigota as mutações mais observadas foram a CD39 e IVS-I-110. Já para os indivíduos com beta talassemia homozigota as mutações mais observadas foram a CD39 e IVS-I-6.

Estudo de Rocha e colaboradores (2010), comparando as frequências de mutações para beta talassemia no Brasil, mostrou que a mutação CD39 é mais frequente para a região Sudeste (50%), seguida da mutação IVS-I-110 (17%), o mesmo foi observado em nosso estudo. Bezerra e colaboradores (2007) avaliaram mutações de beta talassemia em indivíduos provenientes da região Nordeste, observando as mutações IVS-I-6 (54,9%), seguida da CD39 (7,9%), como as mais frequentes e Araújo e seus colaboradores (2003) observaram para a mesma região, que 62,8% dos indivíduos com beta talassemia, apresentavam a mutação IVS-I-6 e 15,1% apresentavam a mutação IVS-I-1, o que se deve à miscigenação ocorrida entre ameríndios, africanos subsaarianos e europeus (portugueses e franceses majoritariamente) nessa região do Brasil. Ainda, Araújo e colaboradores (2003), compararam em seu trabalho, indivíduos beta talassêmicos da região Nordeste e da região Sudeste (Ribeirão Preto), sendo que para a última região as mutações mais observadas foram CD 39 (47%) e IVS-I-110 (27%). Essas diferenças nas mutações observadas podem ser devido ao tipo de colonização que cada local recebeu.

Lemsaddeck e colaboradores (2004) compararam as mutações de beta talassemia encontradas no Marrocos com outros países europeus. Observaram que no Marrocos, a mutação mais frequente foi CD39 (26,2%), seguida da IVS-I-6 (13,9%). Para populações italianas, a mais observada foi também CD39 com 38,8%, seguida da IVS-I-6 (11%); e para populações portuguesas as mais observadas foram CD39 (38%) e IVS-I-1 (28%). Sendo que os indivíduos do presente trabalho são provenientes da região Sudeste, é esperado que as mutações CD39 e IVS-I-110 tenham sido observadas com maior frequência por serem mutações de origem mediterrânea.

Ainda se tratando das mutações observadas para os indivíduos beta talassêmicos heterozigotos, os níveis de Hb F mostraram-se mais elevados para aqueles que apresentaram a mutação CD39, quando comparados aos indivíduos que apresentaram as mutações IVS-I-110 e IVS-I-6. Essa diferença nos níveis de Hb F pode estar relacionada

ao alelo presente em cada mutação, como por exemplo, na mutação CD39 em que não há produção de cadeias beta, por ser classificado como β^0 , o que leva as cadeias α que estão em excesso relativo a se combinarem com outras cadeias, aumentando assim a síntese de outras hemoglobinas, como a Hb F. Para os indivíduos beta talassêmicos homocigotos, não foi possível observar os reais níveis de Hb F dos mesmos, tendo em vista que os baixos valores observados podem refletir o perfil hemoglobínico do indivíduo doador do sangue, já que beta talassêmicos homocigotos necessitam submeter-se a um regime transfusional constantemente.

A presença do polimorfismo *XmnI* foi observada nos três grupos estudados e sua presença pode ter influenciado os níveis mais elevados de Hb F nos indivíduos portadores da afecção. As mutações, o padrão de haplótipos da β -globina, bem como outros polimorfismos nessa família gênica, como o próprio *XmnI*, podem ser responsáveis pelo aumento nos níveis de Hb F, resultando em uma melhor expressão fenotípica nos indivíduos com beta talassemia (CAO et. al.,2011).

Nos indivíduos com beta talassemia heterocigota foram observadas as três condições do polimorfismo (ausência, heterocigose e homocigose), sendo que a maioria dos indivíduos apresentou ausência do mesmo. Para os indivíduos com beta talassemia homocigota não foi observado o padrão mutante homocigoto e para os indivíduos sem alterações de hemoglobina as três condições do polimorfismo foram observadas.

A presença do polimorfismo *XmnI* (pelo menos um alelo mutado) foi observada em 37% dos indivíduos com beta talassemia heterocigota, em 18% para os indivíduos com beta talassemia homocigota e para o grupo de indivíduos sem hemoglobinopatias a frequência foi a mais alta dos três grupos, com 43%.

Estudo anterior, realizado por Chinelato e colaboradores (2011) mostrou que o polimorfismo *XmnI* foi observado em 36,5% dos portadores de beta talassemia heterocigota e em 41,4% dos indivíduos do grupo controle, o que é observado em relatos da literatura, pois o polimorfismo é comum em todos os grupos populacionais e apresenta frequência variando de 32% a 35% (CAO; MOI, 2000; THEIN, 2004; NEISHABURY et al., 2012).

Estudo realizado por Carrocini (2011), com indivíduos da região Sudeste, que não apresentavam queixas de anemia, porém níveis de Hb F aumentados, revelaram frequência de 33,33% para o polimorfismo *XmnI*. Bezerra (2007) observou que 6,4% dos indivíduos beta talassêmicos homocigotos de seu estudo, apresentaram perfil homocigoto para o polimorfismo *XmnI*.

No presente estudo, os indivíduos com beta talassemia heterozigota com pelo menos um alelo mutado (+) para o polimorfismo *XmnI* apresentaram aumento significativo dos níveis de Hb F, em relação aos indivíduos normais (-/-) para o mesmo. Sabe-se que indivíduos portadores de beta talassemia podem apresentar níveis de Hb F aumentados devido à sobrevivência seletiva dos precursores eritróides, que sintetizam mais cadeias gama (γ). Oberoi e colaboradores (2011) observaram aumento significativo de Hb F na presença do sítio polimórfico *XmnI*, em portadores de beta talassemia intermediária na população indiana, bem como Belini-Júnior (2010), que observou aumento nos níveis de Hb F na presença de heterozigose para o polimorfismo *XmnI* em indivíduo portador de anemia falciforme.

Relatos de Sivalingam e colaboradores (2012) indicam a ocorrência do sítio polimórfico em homozigose em 8,8% de indivíduos da Malásia e 8,9% em indivíduos Tailandeses, que apresentavam beta talassemia; e a presença do polimorfismo, de modo geral, mostrou-se relacionada com o aumento do nível de Hb F, durante o estresse hematopoiético.

Em relação aos haplótipos da β -globina, foram observados seis padrões típicos, nos três grupos estudados. Os padrões mais observados nos indivíduos portadores de beta talassemia heterozigota foram os padrões II e VII. Nos indivíduos homozigotos e sem hemoglobinopatias os padrões I e VII foram os mais observados. Para Orkin e colaboradores (1982) que analisaram indivíduos com beta talassemia da região Mediterrânea, os haplótipos mais observados foram o I (47%) e II (17%), o que reflete a grande influência dessas populações na formação e origem da população brasileira. O haplótipo VII foi observado em apenas 6% dos indivíduos estudados por Orkin e colaboradores, entretanto em nosso estudo, esse haplótipo foi observado com grande frequência nos três grupos, o que pode refletir uma característica particular da população da região Sudeste.

Estudo realizado por Rahimi e colaboradores (2009), analisando indivíduos beta talassêmicos do Iran revelou que os haplótipos mais observados foram o I (35,7%), III (28,6%) e o VII (10,2%). Ainda nesse mesmo estudo, indivíduos sem alterações também avaliados, revelaram maior frequência dos haplótipos I (42,9%) e V (14,3%).

No presente trabalho, foram observados 15 padrões atípicos de haplótipos (entre os três grupos), porém, os níveis de Hb F não diferiram significativamente em relação a esses haplótipos atípicos. A maior quantidade de haplótipos atípicos nos indivíduos beta talassêmicos pode ser decorrente do alto grau de miscigenação que a população

brasileira apresenta, resultando em novos padrões de combinação de haplótipos. Para esses padrões de haplótipos atípicos observados, dois deles (Atp 1 e Atp 3) são comuns aos padrões atípicos encontrados por Carrocini (2011), em seu estudo com indivíduos sem queixas de anemia, porém com Hb F aumentada e por Belini-Júnior (2010), sendo para este último somente o padrão atípico 3, observado em indivíduos com doença falciforme. Desse modo, o padrão atípico 3 pode refletir um padrão de haplótipos frequente para indivíduos da região Sudeste do estado de São Paulo.

Em seu estudo com indivíduos beta talassêmicos, Bezerra (2007) observou frequência de 2,4% para o padrão atípico 6. Ainda para este autor o padrão atípico 1, foi associado a mutação rara IVS-I-2.

Estudos vem demonstrando uma associação não randômica entre haplótipos com as mutações de beta talassemia específicas. Os haplótipos do cluster beta globina são ferramentas úteis para a determinação da estrutura genética e da origem das populações, incluindo possíveis associações com mutações e doenças hereditárias (BAHADIR et al.; 2009). Orkin e seus colaboradores (1982) observaram forte desequilíbrio de ligação entre os sítios polimórficos dos haplótipos e as mutações de beta talassemia. Em nosso estudo, para os indivíduos com beta talassemia heterozigota, a mutação CD39 foi observada com frequência de 34% para o padrão de haplótipo II e 27% para o VII. A mutação IVS-I-110 foi observada com frequência de 23% para o haplótipo I e 37% para o haplótipo VII.

Os indivíduos com beta talassemia homozigota apresentaram para a mutação CD39 maior frequência em relação aos haplótipos I (15%) e VII (36%); para a mutação IVS-I-110 a maior frequência foi observada para os haplótipos I (40%) e VII (50%) e para a mutação IVS-I-6, os mais observados foram os haplótipos I e VII, com frequência de 33% cada.

Em populações mediterrâneas a mutação CD39 está ligada aos haplótipos I, II, VII e IX. Para indivíduos com beta talassemia do Iran, analisados por Rahimi e colaboradores (2009), esta mutação esteve associada ao haplótipo VII com 62,5% de frequência. Ele compara ainda sua população de estudo a populações do Líbano, em que essa mutação está ligada aos haplótipos I e II e a populações da Turquia, ligada aos haplótipos I e IV.

Os indivíduos analisados por Lemsaddek e colaboradores (2004), com beta talassemia no Marrocos, apresentaram associação da mutação CD39 com os haplótipos I e II. E o mesmo grupo faz uma comparação com outros países, mostrando que em

Portugal essa mutação está associada aos mesmos padrões e para populações italianas a mutação está associada aos haplótipos I, II, VII e IX. Populações portuguesas e italianas apresentaram associação da mutação IVS-I-6 com os haplótipos VI e VII e ainda a mutação IVS-I-1 nessas populações foi associada aos haplótipos II, III e V.

Para a mutação IVS-I-110 nesse mesmo estudo, indivíduos do Marrocos, apresentaram associação com os haplótipos I e II. Já as populações de Portugal e da Itália, mostraram associação com os haplótipos I e II, II e IX. Rahimi e colaboradores (2009) observaram que a mutação IVS-I-110 esteve associada ao haplótipo I em 50% dos pacientes e que essa associação também ocorre em indivíduos do Líbano e da Turquia. Para populações mediterrâneas, ela está associada aos haplótipos I, II e IX. Bahadir e colaboradores (2009), observaram para indivíduos da Turquia além da associação da mutação IVS-I-110 ao haplótipo I, uma associação também ao haplótipo VII, algo que até então só era observado em populações brasileiras. As análises dos haplótipos pelo programa estatístico Haploview, envolveu os três grupos estudados e em todas elas, os padrões de haplótipos mais frequentes foram o I, II e o VII, o que reforça a origem da população da região Sudeste do Brasil, colonizada principalmente por imigrantes italianos e portugueses, no século XIX. Esse programa estatístico apresentou os valores de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos avaliados. Assim, os sítios $5'\gamma^G/\gamma^G$ e $\gamma^G/\Psi\beta$ apresentaram forte desequilíbrio de ligação.

A análise das manifestações clínicas, nos indivíduos com beta talassemia homocigota, obtidas pela consulta de prontuário, revelou que apenas 19% dos indivíduos apresentam alterações craniofaciais. Sabe-se que alterações craniofaciais podem ser observadas quando o indivíduo não recebeu tratamento correto e precoce, porém essa característica torna-se de avaliação subjetiva tendo em vista que não há como saber em que momento de sua vida o indivíduo que as apresenta essas teve seu tratamento negligenciado. Sendo a medula óssea responsável pela produção dos eritrócitos, nesses indivíduos ela pode sofrer um aumento de até 30 vezes o seu tamanho normal, com isso, os ossos crescem mais do que o usual, o que pode levar à deformidades (ABRASTA).

Outro parâmetro clínico avaliado foi a sobrecarga de ferro em órgãos como coração e fígado. Todos os indivíduos com beta talassemia homocigota avaliados apresentaram sobrecarga no fígado e apenas um indivíduo apresentou sobrecarga no coração. Segundo os Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010) têm-se o fígado como um depósito de ferro transfundido nesses

indivíduos. Esse acúmulo pode se manifestar a partir do segundo ano da terapia transfusional, o que pode ocasionar uma fibrose portal em alguns indivíduos. O coração é mais suscetível do que o fígado ao efeito tóxico do ferro, devido à sua menor capacidade de síntese de ferritina e mesmo em quantidades pequenas, o ferro livre pode gerar metabólitos tóxicos.

Sabendo que os valores de sobrecarga de ferro nesses indivíduos são em sua maioria, consequências da hipertransfusão a que são submetidos, e que os níveis de Hb F podem estar mascarados pelo perfil do doador, não foi possível relacionar as manifestações clínicas dos indivíduos com beta talassemia homozigota com os polimorfismos genéticos avaliados, não podendo assim, atribuir os resultados obtidos aos fatores genéticos da afecção.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- ✓ O polimorfismo *XmnI*, observado em todos os grupos estudados, está presente em 37% dos indivíduos com beta talassemia heterozigota, 18% nos com beta talassemia homozigota e em 43% dos indivíduos sem hemoglobinopatias.

- ✓ Foram observados padrões típicos e atípicos de haplótipos da β -globina nos grupos estudados, sendo os padrões típicos nos três grupos: I, II, IV, VI, VII e IX. Os haplótipos típicos mais observados foram os padrões I, II e VII.

- ✓ Os níveis de Hb F em indivíduos beta talassêmicos heterozigotos, revelaram-se aumentados na presença do polimorfismo *XmnI*. O padrão de haplótipo típico IV esteve, nesse estudo, relacionado aos maiores níveis de Hb F em indivíduos com beta talassemia heterozigota.

- ✓ O padrão de haplótipo típico IV esteve, nesse estudo, relacionado aos maiores níveis de Hb F em indivíduos com beta talassemia heterozigota.

- ✓ Não foi possível relacionar a influência dos sítios polimórficos avaliados em relação as manifestações clínicas nos indivíduos com beta talassemia homozigota, tendo em vista que os mesmo encontram-se constantemente em regime transfusional.

Referências

7 REFERÊNCIAS

ABRASTA. Associação Brasileira de Talassemia. < <http://www.abrasta.org.br/tipos-talassemia>> Acesso em 16 de agosto de 2013.

ANSARI, S. H.; SHAMSI, T. S.; MUNZIR, S.; et al. $\text{G}\gamma\text{-XmnI}$ Polymorphism: A Significant Determinant of β -Thalassemia Treatment Without Blood Transfusion. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**. v. 35, n. 4, 2013.

ARAÚJO, A.S.; SILVA, I. W.; LEÃO, S. A.; et al. A different molecular pattern of beta-thalassemia mutations in northeast Brazil. **Hemoglobin**, v. 27, p. 211-7, 2003.

AYDINOK, Y. Thalassemia. **Hematology**, v. 17, suppl. 1, 2012.

BAHADIR, A.; ÖZTÜRK, O.; ATALAY, A.; et al. Beta globin gene cluster haplotypes of the beta thalassemia mutations observed in the Denizli province of Turkey. **Turkish Journal of Hematology**. 26: 129-37, 2009.

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.

BERTHOLO, L. C. **Amplificação gênica alelo específica e multiplex no diagnóstico laboratorial de hemoglobinas anormais**. 2005. 92f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2005.

BEZERRA, M.A.C.; SANTOS, M.N.N.; ARAÚJO, A.S.; et al. Molecular variations linked to the grouping of β - and α -globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the state of Pernambuco, Brazil. **Hemoglobin**. v.31, n. 1, p. 1-6, 2007.

BONINI-DOMINGOS, C. R. Thalassemia screening in Brazil – Results for 20 years. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 288-289, 2004.

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

BUNN, H.F.; FORGET, B.G. Molecular Genetics and Biosynthesis of Hemoglobin. In: BUNN, H.F.; FORGET, B.G. **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. 1st edition. Philadelphia, P.A, USA, Saunders Company, p. 169-222, 1986.

CAO, A.; SABA, L.; GALANELLO, R.; et al. Molecular diagnosis and carrier screening for β -thalassemia. **Journal of the American Medical Association**. v. 278, p. 1273-1277, 1997.

CAO, A.; MOI, P. Genetic modifying factors in β -thalassemia. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v. 38, p. 123–132, 2000.

CAO, A.; MOI, P.; GALANELLO, R. Recent advances in β -thalassemias. **Pediatric Reports**, v. 3:e17, 2011.

CARROCINI, G. C. S. **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 de Mestrado, Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, SP, 120p, 2011.

COSTA, F.C.; FEDOSYUK, H.; NEADES, R.; et al. Induction of Fetal Hemoglobin In Vivo Mediated by a Synthetic γ -Globin Zinc Finger Activator. **Anemia**, v 2012, Article ID 507894, 8 pages, 2012.

CASTRO, C. M.; PEREIRA, A. S. Mapeamento por associação em plantas: conceitos básicos e perspectivas de uso no melhoramento de batata. **Embrapa Clima Temperado. Documentos, 248**: Pelotas, 2008.

CHINELATO, I. S.; CARROCINI, G. C. S.; BONINI-DOMINGOS, C. R. *XmnI* polymorphism frequency in heterozygote beta thalassemia subjects and its relation to Fetal hemoglobin levels. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 33(6): 483, 2011;

GALANELLO, R.; CAO, A. Relationship Between Genotype and Phenotype. **Annals New York of Sciences**. v. 850, p. 325-333, 1998.

GALANELLO, R.; ORIGA, R. Beta-thalassemia. **Orphanet Journal of Rare Diseases** v. 5, p. 11, 2010.

HASHEMIEH, M.; AZARKEIVAN, A.; AKHLAGHPoor, S.; et. al. T2-star (T2*) Magnetic Resonance Imaging for Assessment of Kidney Iron Overload in Thalassemic Patients. **Archives of Iranian Medicine**, v. 15, n. 2, 2012

HIGGS, D.R. α -Thalassaemia. In: **Baillière`s Clinical Haematology**. v. 6, n. 1, p. 117-150, 1993.

HIGGS, D. R., ENEGEL, J. D., STAMATOYANNOPOULOS, G. Thalassaemia. **Lancet**. 379: 373–83, 2012.

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

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 dezembro de 2013.

LEMSADDEK, W.; PICANÇO, I.; SEUANES, F.; et al. The b-Thalassemia Mutation/Haplotype Distribution in the Moroccan Population. **Hemoglobin**. v. 28, n. 1, p. 25–37, 2004.

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

MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetato. **Journal of Clinical Pathology**, 1965.

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.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas (PCDT)**, 2010. <<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/consulta-publica/106706-44.html>> Acesso em 16 de agosto de 2013.

MIRANDA, S.R.P.; FONSECA, S.F.; FIGUEIREDO, M.S.; et al. Hb Köln [$\alpha 2\beta 298(\text{FG}5) \text{Val} \rightarrow \text{Met}$] identified by DNA analysis in a Brazilian family. **Brazilian Journal of Genetics**. 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.

MUSOLLINO, G.; MASTROLONARDO, G.; PREZIOSO, R.; et al. Molecular mechanisms of a novel β -thalassaemia mutation due to the duplication of tetranucleotide 'AGCT' at the junction IVS-II/exon 3. **Ann Hematology**, v 91, Issue 11, p 1695-1701, 2012.

NAGEL, R.L. The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic, and anthropological consequences. **Einstein Quarterly Journal of Biology and Medicine**. v. 2, p. 53-62, 1984.

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

NEISHABURY, M.; ZAMANI, S.; AZARKEIVAN, A; et al. The modifying effect of Xmn1-HBG2 on thalassaemic phenotype is associated with its linked elements in the beta globin locus control region, including the palindromic site at 5'HS4. **Blood Cells, Molecules & Diseases**. v. 48, p. 1-5, 2012.

NEMETH, E.; Hpcidin and β -thalassemia major. **Blood**, v. 122, n. 1, p. 1-4, 2013.

NUSSBAUM, R.L.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F. **Thompson & Thompson: Genética Médica**. 7a ed, Editora Guanabara, Rio de Janeiro, cap. 11, p. 243-264, 2007.

OBEROI, S.; DAS, R.; PANIGRAHI, I.; et al. Xmn1- γ Polymorphism and Clinical Predictors of Severity of Disease in β -Thalassemia Intermedia. **Pediatric Blood Cancer**. 57:1025–1028, 2011.

ORKIN, S.H.; KAZAZIAN JR., 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.

PANDEY, S.; PANDEY, S; MISHRA, M. R.; et al. Modulating effect of the -158 γ^G (C \rightarrow T) *Xmn1* polymorphism in Indian Sickle Cell patients. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**. v. 4, n. 1, 2012.

PENNELL, D. J.; Cardiovascular Function and Treatment in β -Thalassemia Major: A Consensus Statement From the American Heart Association. **Circulation**. n.128: p.281-308, 2013.

RAHIMI, Z.; MUNIZ, A.; AKRAMIPOUR, R.; et al. Haplotype analysis of beta thalassemia patients in Western Iran. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**. n. 42, p.140–143, 2009.

ROCHA, L. B. S.; MARTINS, M. F.; GONÇALVES, R. P. Distribuição das mutações da β -talassemia em Fortaleza, Ceará. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 46, n. 6, p. 437-441, 2010.

ROY, P.; BHATTACHARYA, G.; MANDAL, A.; et al. Influence of BCL11A, HBS1L-Myb, HBBP1 single nucleotide polymorphisms and the HBG2 *XmnI* Polymorphism on Hb F levels. **Hemoglobin**. 36 (6): 592-599, 2012.

SAIKI, R.K. The design and optimization of the PCR. In: ERLICH, H.A. **PCR technology - Principles and applications for DNA amplification**. New York: Oxford University: Ty Press. p. 7-16, 1992.

SAMBROOK, J.; FRITCSH, E.F.; MANATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, ed.2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHECHTER, A. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v. 112, n. 10, 2008.

SILVA, A. R. **Análise genética de caracteres quantitativos em milho com o delineamento III e marcadores moleculares**. Tese de doutorado apresentada a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ/USP. Piracicaba, 143 p. 2002.

SILVEIRA, Z. M. L.; BARBOSA, M. V.; FERNANDES, T. A. A. M.; et al. Characterization of beta-thalassemia mutations in patients from the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.34, n.3, p. 425-428, 2011.

SILVESTRONI, E; BIANCO, I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. **American Journal of Human Genetics**.1975.

SIVALINGAM, M.; et al. **Molecular study and genotype/phenotype correlation of β thalassemia in Malaysia**. *Int. Jnl. Lab. Hem*, 34, p. 377–382, 2012.

SONATI, M. F., COSTA, F. F. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. **The Journal of Pediatrics**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 4, p. S40-S51, 2008.

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

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. **American Journal of Hematology**, v. 32, p. 66-69, 1989.

THEIN, S. L. Genetic insights into the clinical diversity of β thalassemia. **British Journal of Haematology**, v. 124, p. 264-274, 2004.

THEIN, S. L. 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.

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

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

WALKER, H. K. et al. **Clinical Methods**. Stoneham: Butterworth Publishers, 1990.

WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. **The Thalassaemia Syndromes**. 3th Ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1981.

WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. **The Thalassaemia Syndromes**. 4th Ed. Oxford: Blackwell Scientific, 2001.

XU, X.S.; 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**, v. 2, n. 15, p. 1-11, 2009.

ZAGO, M.A.; COSTA, F.F.; TONE, L.G.; et al. Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population. **Human Heredity**. v. 33, n. 2, p. 125-129, 1983.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2004.

Apêndices

Apêndice 1: Planilha com informações dos indivíduos Beta Talassêmicos Heterozigotos:

Código	Mutação	Hb A ₂	Hb F	Idade	Sexo	XmnI	H ₂ H ₃	H ₃ H ₄	H ₅ H ₆	H ₇ H ₈	SF ₁ SF ₂	P ₁ P ₅	Haplótipo
1	IVS-I-110	5,3	0,7	74	F	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	I/I
2	CD39	5,3	0	68	M	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	I/II
5	CD39	6,2	7,1	18	M	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	I/II
6	CD39	6,4	0,7	22	M	-/-	+/-	+/-	-/-	+/+	+/+	+/+	II/ atp 1
7	CD39	6	0,5	30	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
8	IVS-I-110	5,5	0,6	53	M	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
20	IVS-I-110	5,3	2	18	M	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
21	IVS-I-6	6,1	0,8	16	M	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
29	CD39	6,5	0	70	M	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
36	Outras	5,5	1,2	33	M	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
40	CD39	6,2	1,3	56	F	-/-	+/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	II/atp 2
51	CD39	8,7	3,4	21	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
52	IVS-I-110	6,3	0,6	31	M	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
54	IVS-I-110	4,5	2	21	F	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/+	+/+	I/atp 3
56	CD39	5,5	0	17	F	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
57	IVS-I-110	5,9	0,4	21	F	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
60	IVS-I-110	4,8	0	54	F	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
62	IVS-I-110	5,6	2,1	13	M	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	VII/atp 1
65	IVS-I-110	6,6	1,4	17	F	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
67	CD39	4,3	0,7	40	F	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
68	CD39	5,8	1,5	46	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
69	CD39	7,3	0,9	15	M	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
76	Outras	3,1	6,5	79	F	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
78	IVS-I-6	5	0,4	70	F	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII

Código	Mutação	Hb A₂	Hb F	Idade	Sexo	XmnI	H₂H₃	H₃H₄	H₅H₆	H₇H₈	SF₁SF₂	P₁P₅	Haplótipo
83	Outras	3	5	54	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
84	Outras	3,1	4,4	19	M	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
87	CD39	5,6	1,2	24	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
93	CD39	5,4	1	19	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
95	CD39	6,4	0,4	26	M	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
97	CD39	5,2	0,9	78	F	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	II/atp4
101	CD39	5,7	0,5	79	F	-/-	+/-	+/+	-/-	+/-	+/-	+/+	II/atp5
102	CD39	6,3	1,9	44	F	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	II/atp4
104	CD39	5,8	0,9	22	M	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
114	IVS-I-110	5,4	2,2	41	F	-/-	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	I/IV
120	Outras	6,2	3,5	52	F	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	-/-	+/+	IV/VII
123	CD39	5,9	0,8	82	F	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	II/atp4
129	Outras	4,6	1,6	43	F	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
131	Outras	5,6	3,7	21	F	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
132	CD39	5,2	1,1	27	F	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
134	CD39	5,8	5	71	M	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	II/atp4
135	CD39	8,6	10	29	M	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
137	CD39	5,1	1,2	17	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
138	CD39	6	1	17	M	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
145	IVS-I-110	5	0,9	68	F	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
146	CD39	3,5	0,4	20	M	-/-	+/-	+/-	-/-	+/+	+/-	+/+	II/atp6
156	IVS-I-6	5	1,4	37	M	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
157	CD39	6,4	0	10	M	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
161	IVS-I-110	5,2	0,4	40	M	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/+	+/+	I/atp3
162	IVS-I-110	5,5	1,2	25	F	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
169	CD39	5,8	0,8	33	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII

Código	Mutação	Hb A₂	Hb F	Idade	Sexo	XmnI	H₂H₃	H₃H₄	H₅H₆	H₇H₈	SF₁SF₂	P₁P₅	Haplótipo
170	IVS-I-110	4,6	0	69	M	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	I/II
171	CD39	5,6	0	78	M	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
173	CD39	5,6	1,8	19	F	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
175	CD39	6,9	0,6	41	M	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
177	Outras	2,2	13,3	51	M	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
181	IVS-I-110	4,1	0,6	52	F	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/atp13
183	CD39	5,5	0	48	F	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
186	CD39	6,1	7	33	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/+	+/-	+/+	II/atp6
187	IVS-I-110	6,3	1,2	54	M	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/atp13
190	IVS-I-110	5	2,4	15	F	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
191	CD39	6	0,5	31	M	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	II/atp4
194	IVS-I-6	6,1	3,2	28	M	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
198	CD39	6,3	0	42	M	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
201	CD39	5,8	2,2	32	F	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
202	CD39	5,9	0,9	72	F	-/-	+/-	+/+	-/-	+/+	+/-	+/+	II/atp7
204	IVS-I-110	5,1	0,4	38	F	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/atp13
208	IVS-I-6	6,2	1	34	M	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	-/-	+/+	IV/VII
209	CD39	5,4	0,7	53	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
211	IVS-I-110	5,7	0,9	78	F	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
213	IVS-I-110	4,8	0,8	17	F	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/+	VII/atp14
214	IVS-I-110	5,3	0,5	47	M	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
215	CD39	5,5	1,5	52	M	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
218	IVS-I-110	6,4	1	23	F	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
219	CD39	6,9	1,9	50	F	-/-	+/+	+/-	-/-	+/+	+/+	+/+	II/atp3
220	CD39	5,6	4,1	15	F	-/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	atp12/ atp12
221	CD39	5,9	1,5	15	F	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/-	+/+	IV/IX

Código	Mutação	Hb A₂	Hb F	Idade	Sexo	XmnI	H₂H₃	H₃H₄	H₅H₆	H₇H₈	SF₁SF₂	P₁P₅	Haplótipo
223	CD39	5,4	1,9	42	F	+/-	+/+	+/-	-/-	+/+	+/-	+/+	II/ atp8
226	IVS-I-6	5,1	0,5	30	F	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	VII/apt1
227	IVS-I-110	6	0	28	M	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	I/II
233	IVS-I-6	4,8	0	56	M	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	I/II
237	Outras	3	4,9	24	M	+/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	VI/ atp12
245	IVS-I-110	5,4	0	30	M	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
S 110	CD39	5,6	2,9	25	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	I/II
S 111	CD39	5,9	0,9	24	F	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
S1	CD39	5,9	0	31	M	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	atp6/atp15
S100	CD39	5,9	1,8	51	M	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/+	VII/atp10
S102	CD39	5,9	3,3	29	F	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	VII/atp9
S103	CD39	5,5	6,6	29	F	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
S104	CD39	6	7	16	F	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	-/-	+/+	IV/VII
S105	CD39	6,5	5,6	10	F	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	-/-	+/+	IV/VII
S106	IVS-I-110	5,6	3,3	32	M	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	VII/VII
S108	CD39	6,3	2,7	11	M	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	-/-	+/+	IV/atp7
S113	Outras	5,4	0,9	25	F	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/+	VII/ atp
S116	CD39	6,4	3,3	15	F	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/atp17
S16	CD39	5,9	6,1	45	F	+/-	+/+	+/-	+/-	+/+	-/-	+/+	IV/atp10
S19	CD39	6,2	5,4	17	M	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
S20	CD39	5,7	5,6	20	M	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	IX/IX
S21	CD39	5,2	1,7	32	F	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	II/II
S24	CD39	4,6	1,8	36	F	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
S27	IVS-I-6	8,2	1,2	15	F	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	VII/atp1
S30	CD39	5,2	2,6	44	F	+/-	+/-	+/-	-/-	+/+	+/+	+/+	II/atp1
S31	CD39	5,6	1,2	15	M	+/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/+	+/+	II/ IV

Código	Mutação	Hb A₂	Hb F	Idade	Sexo	XmnI	H₂H₃	H₃H₄	H₅H₆	H₇H₈	SF₁SF₂	P₁P₅	Haplótipo
S49	CD39	6,1	2,3	39	F	-/-	+/+	+/-	-/-	+/+	+/+	+/+	II/atp3
S51	CD39	6,4	1,1	49	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
S52	CD39	6,6	1	17	M	+/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/+	+/+	II/ VII
S53	CD39	6,6	0	65	M	+/-	+/+	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/atp9
S57	CD39	6,5	2	15	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
S67	CD39	5,6	2	13	M	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	II/II
S68	CD39	5,7	2,3	13	F	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	II/II
S70	CD39	6,3	1,8	40	M	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
S71	CD39	6,1	0,9	44	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
S73	CD39	6,3	1,8	19	M	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	II/II
S83	CD39	6,2	0,6	65	M	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
S84	CD39	6,4	1,9	24	F	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	-/-	+/+	VII/atp11
S85	IVS-I-110	5,9	0,6	54	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
S86	CD39	5,7	0,8	32	F	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	VI/VI
S87	CD39	6,1	0,7	38	F	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	VI/VI
S88	CD39	5,5	7,3	48	F	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	atp9/atp12
S89	CD39	5,6	2,8	51	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
S90	CD39	5,4	1,6	19	M	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/+	VII/atp5
S91	CD39	5,6	1,6	46	F	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	VII/atp3
S92	CD39	5,9	1,9	40	M	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	IX/IX
S93	CD39	5,6	1,3	53	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
S97	CD39	5,7	1,5	15	M	-/-	+/+	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+	II/atp3
S98	IVS-I-110	5,5	1,1	18	F	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/atp12
S99	CD39	5,5	1,1	15	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/+	+/+	+/+	II/atp1
246	IVS-I-110	5,3	0	40	F	-/-	+/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	II/atp2
247	CD39	6,3	1,4	34	F	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	II/II

Código	Mutação	Hb A₂	Hb F	Idade	Sexo	XmnI	H₂H₃	H₃H₄	H₅H₆	H₇H₈	SF₁SF₂	P₁P₅	Haplótipo
248	IVS-I-110	5,1	0	55	M	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	VII/VII
249	CD39	6,3	1,4	22	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	I/II
250	CD39	6,3	0	41	F	+/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/+	+/+	II/IX
251	CD39	6,2	0	50	M	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	II/II
252	IVS-I-110	4,3	0	32	M	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
253	IVS-I-110	4,8	0,5	69	F	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	VII/atp1
254	IVS-I-110	5,2	1,1	59	F	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	VII/VII
255	CD39	5,8	0,9	34	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
256	IVS-I-110	5,4	9,7	14	F	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/atp12
257	IVS-I-110	5,3	11	37	F	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	VII/atp3
258	IVS-I-110	5,3	6,6	66	F	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	VII/atp9
117	CD39	5,4	1	31	F	+/-	+/+	+/-	-/-	+/+	+/+	+/+	II/atp3
259	Outras	6,1	0,0	75	F	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	VII/atp
260	CD39	6,3	0,9	25	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/+	+/+	+/+	II/atp1
261	CD39	5,8	1,1	39	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
262	IVS-I-110	5,5	0,4	30	F	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
263	CD39	5,8	3,2	33	F	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	VII/atp3
264	IVS-I-110	6,3	1,8	32	M	+/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/+	+/+	II/ VII
265	CD39	6,4	5	49	M	+/-	+/+	+/-	-/-	+/+	+/-	+/+	II/ VII
266	IVS-I-110	5,5	0,8	77	F	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
267	IVS-I-110	5,8	0,5	52	F	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII/IX
268	CD39	6	0,8	55	M	+/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	II /IV

Apêndice 2: Planilha com informações dos indivíduos Beta Talassêmicos Homozigotos:

Cód.	Mutação	Hb A ₂	Hb F	Idade	Sexo	<i>XmnI</i>	H ₂ H ₃	H ₃ H ₄	H ₅ H ₆	H ₇ H ₈	SF ₁ SF ₂	P ₁ P ₅	Haplótipo
BT01	-29 / IVS-I-5	3,4	6,8	57	M	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	I e VII
BT02	CD39/IVSI-6	3,1	1,4	14	F	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I e VII
BT03	IVS-I-6/ IVS-I-5	3.3	3.0		M	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I e VII
BT05	Sequenciamento	3.0	11.4		M	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	VII e VII
BT06	Sequenciamento	3,1	0,9	13	M	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I e VII
BT07	IVS-I110/IVS-I6	3.0	1,5		F	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I e VII
BT08	CD39 / CD24	5,5	45,1	58	M	+/-	+/+	-/-	+/-	+/+	+/-	+/+	IV e IV
BT09	IVSI110/IVSI110	3.0	7,5	24	M	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I e VII
BT10	CD39/IVSI110	3,1	3,2	14	M	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII e IX
BT11	IVSI6 / cap+20	3,7	2,1	16	M	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I e VII
BT12	IVSI6/IVSI6	7,5	18,3	42	F	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	+/-	+/+	VI e atp14
BT13	CD39 / cap+20	3,1	0,6		M	-/-	+/+	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II e VI
BT14	Sequenciamento	6,2	2,6	57	M	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I e VII
BT15	CD39 / CD15	3,4	22,6		F	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	atp11 e atp11
BT16	CD39/IVSI110	2,9	1,9	30	M	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I e VII
BT17	IVSI110/IVSI6	3,1	2	23	F	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I e VII
BT18	IVSI6 / Seq	4,4	8,6	47	M	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I e VII
BT19	IVSI6 / -88	10,4	14,8	25	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II e VI
BT20	CD39 / Seq	2,9	3,3		M	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	VII e VII
BT21	Sequenciamento	4,7	6,2	27	F	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I e VII
BT22	IVSI6/ Seq	6,7	8,5	29	F	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	+/-	+/+	VI e atp14
BT 23	Sequenciamento	3,6	2,3	34	F	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I e II

Apêndice 3: Planilha com as informações clínicas dos indivíduos Beta Talassêmicos Homozigotos:

Cód.	Clasf. Clínica	Sobrc. de Ferro (órgãos)	T2* fígado^A	T2* coração^B	Outra clínica relevante
BT01	Intermediário	Fígado	NR	20	Úlcera de membro inferior; osteoporose
BT02	Maior	Já teve: Coração - Tem: Fígado	NR	33.4	-
BT03	Maior	Fígado	NR	NR	-
BT05	Maior	Fígado	NR	NR	-
BT06	Intermediário	Fígado	4.46	44.84	-
BT07	Maior	Fígado	NR	NR	-
BT08	Intermediário	Fígado	2.69	NR	Úlcera de membro inferior
BT09	Maior	Fígado	3.01	35.7	Esplenectomia; sequela de face
BT10	Maior	Fígado	NR	NR	Esplenectomia
BT11	Maior	Fígado	2.19	25.19	-
BT12	Intermediário	Fígado	1.0	NR	Esplenectomia; osteoporose; feto com cardiopatia
BT13	Maior	Fígado	NR	NR	
BT14	Intermediário	Fígado	1.19	47.39	Esplenomegalia
BT15	Maior	Fígado	NR	NR	Úlcera de membro inferior; esplenectomia; sequela de face
BT16	Maior	Fígado	NR	NR	Sequela de face
BT17	Maior	Fígado	1.27	36.1	
BT18	Intermediário	Fígado	NR	NR	Osteoporose
BT19	Intermediário	Fígado	0.59	35.09	Esplenectomia; sequela de face; crise de dores abdominais e torácicas
BT20	Intermediário	Grave: Fígado e Coração	NR	NR	
BT21	Maior	Fígado	NR	NR	Aborto espontâneo
BT22	Intermediário	Fígado	NR	NR	
BT 23	Intermediário	Fígado	2.2ms	26.31ms	Úlcera de membro inferior; esplenomegalia

NR: Dados Não Relatados

A: T2* no fígado (N>11,4 ms)

B: T2* no coração (N> 20 ms)

Apêndice 4: Planilha com informações dos indivíduos sem hemoglobinopatias:

Cód.	Hb F	Hb A₂	Gênero	Idade	XmnI	H₂H₃	H₃H₄	H₅H₆	H₇H₈	SF₁SF₂	P₁P₅	Haplótipo
LN 2	0,3	3,2	F	52	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	VII/VII
LN 3	0,0	3,1	M	51	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 5	0,0	3,0	M	46	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/+	II/VII
LN 6	0,8	3,5	F	48	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	VII/VII
LN 8	0,0	3,5	F	71	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
LN 9	0,7	3,3	M	42	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/-	+/+	IV /IX
LN 10	0,0	3,5	F	53	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
LN 15	0,0	3,3	F	37	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 17	0,0	3,3	F	40	+/-	+/+	+/+	+/-	+/+	+/-	+/+	II/II
LN 25	0,0	3,2	F	28	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	IV/VII
LN 29	0,0	2,9	M	26	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	II/II
LN 30	0,0	2,3	M	26	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 31	0,0	2,5	F	25	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 33	0,7	2,8	F	41	+/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	II/atp 11
LN 39	1,2	2,6	F	27	-/-	+/-	+/-	-/-	+/+	+/-	+/+	II/II
LN 41	0,7	2,5	M	23	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	IV/VII
LN 42	0,0	2,5	M	28	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
LN 45	0,7	3,0	F	46	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	IV/VII
LN 48	0,3	2,6	F	29	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I /VII
LN 50	0,0	2,0	F	24	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
LN 57	0,0	2,6	M	64	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 61	0,0	2,7	F	47	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 62			F	33	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 65	0,6	2,8	F	26	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	IV/IX

Cód.	Hb F	Hb A₂	Gênero	Idade	XmnI	H₂H₃	H₃H₄	H₅H₆	H₇H₈	SF₁SF₂	P₁P₅	Haplótipo
LN 67			F	26	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	IV/IX
LN 69			F	26	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	II/IV
LN 70			M	30	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
LN 78	0,0	2,8	M	32	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I/VII
LN 79	0,0	3,0	M	37	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
LN 82	0,3	3,2	F	23	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
LN 85	0,4	2,7	M	29	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
LN 90	0,5	3,5	M	34	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
LN 91	0,5	3,0	M	26	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
LN 95	0,0	3,0	M	48	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
LN 96	0,0	3,0	F	26	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	II/VII
LN 99	0,0	3,5	F	54	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	IV/VII
LN 107	0,5	3,5	M	63	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/-	+/+	IV/IX
LN 108			M	37	-/-	+/-	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+	atp 9 /atp 5
LN 111			M	52	-/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	II/IV
LN 113	0,0	3,0	M	34	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	II/IV
LN 114	0,5	3,5	M	41	+/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	II/IV
LN 115	0,0	2,8	M	60	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	IV/VII
LN 118	0,2	2,8	M	59	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VII
LN 123	1,0	3,0	M	22	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	IV/VII
LN 124	0,9	3,5	M	41	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/-	+/+	IV/IV
LN 127			M	50	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	I/VII
LN 128			F	54	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/-	+/+	II/II
LN 135	0,4	3,5	M	45	-/-	+/-	-/-	-/-	+/+	+/-	+/+	atp 3 /atp 6
LN 140			F	47	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	I/I
LN 145			M	24	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	VII/VII

Cód.	Hb F	Hb A₂	Gênero	Idade	X_{mn}I	H₂H₃	H₃H₄	H₅H₆	H₇H₈	SF₁SF₂	P₁P₅	Haplótipo
LN 151			M	30	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	I/VII
LN 153	0,0	2,6	M	38	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	I/VII
LN 154	0,0	3,0	M	53	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/-	+/+	IV/IV
LN 155	1,0	3,5	F	65	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 164	0,0	3,0	F	34	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/+	+/+	I/I
LN 166	0,0	2,8	F	48	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 168	0,8	3,2	F	57	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 171			F	30	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	+/-	+/+	VI/VI
LN 174			M	31	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	+/+	IX/IX
LN 178			F	21	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	I/VII
LN 182			F	25	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 190	0,0	2,6	M	48	+/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	II /IX
LN 191	0,0	3,0	M	37	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	+/+	I/I
LN 193	0,0	3,0	M	52	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/-	+/+	II/II
LN 195			M	22	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I /VII
LN 196			M	59	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I/II
LN 197	0,0	3,5	M	29	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 204	0,5	3,5	M	48	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I/II
LN 205	0,1	3,2	M	48	+/-	+/+	-/-	+/-	+/+	+/-	+/+	IV/IV
LN 207	0,0	3,0	F	46	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	I/IV
LN 211	0,0	3,0	F	45	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	I/IV
LN 213			F	36	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/-	+/+	IV /IX
LN 215			F	29	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 219	0,0	3,5	M	39	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I/II
LN 222	0,3	2,8	M	60	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/+	IV /VII
LN 226	0,0	3,0	F	44	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	I/IV

Cód.	Hb F	Hb A₂	Gênero	Idade	XmnI	H₂H₃	H₃H₄	H₅H₆	H₇H₈	SF₁SF₂	P₁P₅	Haplótipo
LN 227			M	38	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I/II
LN 237			M	42	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 240	0,0	3,0	M	36	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	-/-	+/+	IV /VII
LN 241	0,0	2,9	M	37	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	I/IX
LN 242	1,0	2,8	M	49	-/-	+/-	+/-	-/-	+/+	+/-	+/+	IV /IX
LN 245	0,5	2,9	M	47	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 249	0,0	3,0	F	58	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/-	+/+	IV /IX
LN 256	0,0	3,0	F	42	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I /VII
LN 260	0,0	3,0	M	34	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/-	+/+	IV /IX
LN 263			M	50	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 265			M	29	-/-	+/-	+/-	-/-	+/+	+/-	+/+	I /VII
LN 268			M	62	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 274	0,2	2,9	M	31	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I /VII
LN 275	0,0	3,0	F	33	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	I /II
LN 280	0,0	2,5	M	50	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	VII/VII
LN 281	0,2	2,8	M	40	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	I /II
LN 283	0,8	3,0	F	25	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	+/+	I/I
LN 286			M	50	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	I/IV
LN 294			M	51	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I /VII
LN 297			M	26	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 298	0,2	3,4	M	37	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	I/IV
LN 300	0,0	3,0	M	47	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	I/IV
LN 302	0,0	3,2	M	46	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I/II
LN 312	0,0	3,5	M	51	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I/II
LN 315	0,5	3,0	M	31	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 318	0,5	3,4	M	22	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII

Cód.	Hb F	Hb A₂	Gênero	Idade	X_{mn}I	H₂H₃	H₃H₄	H₅H₆	H₇H₈	SF₁SF₂	P₁P₅	Haplótipo
LN 321	0,8	3,0	M	45	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/-	+/+	IV /IX
LN 343	0,8	3,5	F	44	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I /VII
LN 347	0,0	3,2	M	35	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I /VII
LN 348			M	78	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 349			F	38	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I /VII
LN 351			F	35	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 352	0,2	3,0	M	29	+/-	+/+	-/-	+/-	+/+	+/-	+/+	IV /VII
LN 355	0,2	2,9	M	39	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	II/IV
LN 358	0,2	3,0	F	31	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I/II
LN 359	0,3	2,9	M	25	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	II/IX
LN 369	0,9	2,9	M	41	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 371	0,0	3,0	M	39	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I/VI
LN 374	0,2	3,0	M	29	-/-	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	I/VI
LN 375	0,4	3,2	M	49	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	I/II
LN 376			M	41	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I /VII
LN 381			F	42	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/+	I /VII
LN 383			M	30	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I/VI
LN 384			F	41	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 385			M	41	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 387	0,0	3,0	F	45	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 389	0,2	3,2	M	24	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 390			F	52	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 394			F	23	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 395			F	49	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	+/+	II/IX
LN 398	0,9	3,2	M	47	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 408	0,0	3,0	F	41	+/-	+/+	+/+	+/-	+/+	+/-	+/+	II/II

Cód.	Hb F	Hb A₂	Gênero	Idade	X_{mn}I	H₂H₃	H₃H₄	H₅H₆	H₇H₈	SF₁SF₂	P₁P₅	Haplótipo
LN 422			F	44	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/-	+/+	IV/atp1
LN 432			M	43	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	I/IX
LN 437			M	25	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	I/IX
LN 444	0,0	3,0	M	50	+/-	+/+	+/-	-/-	+/+	+/-	+/+	II/II
LN 448			M	25	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	I/IX
LN 449	0,2	2,9	M	34	-/-	+/-	+/+	-/-	+/-	+/-	+/+	II /VI
LN 452			M	38	+/+	+/+	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	IV /IX
LN 458			M	59	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/-	+/+	IV /IX
LN 460			M	29	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	I / II
LN 461			M	24	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LN 464			M	25	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/-	+/+	II/II
LN 466	0,8	2,8	F	30	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	I/IX
LL 3	0,8	3,2	M	46	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	I /VII
LL 9			M	49	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LL 17			M	45	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/-	+/+	IV /IX
LL 20			M	45	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
LL 25			M	49	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	I/VII
LL 36	0,0	3,0	M	39	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	I /VII
CB 122			M	27	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	-/-	+/+	IV /VII
LG 6			M	25	+/-	+/+	-/-	+/-	+/+	+/-	+/+	IV /IX
LG 9			F	26	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	I/IX
LG 10			M	30	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	I/VII

Apêndice 5: Artigo a ser submetido à Revista Translational Research (The Journal of Laboratory and Clinical Medicine) ISSN: 1931-5244, Fator de Impacto: 3,490.

Influência dos haplótipos da beta globina nos níveis de Hb F em indivíduos com beta talassemia no Brasil.

CHINELATO, I. S.; CARROCINI, G. C. S.; VENÂNCIO, L. P. R.; TORRES, L. S.; LOBO, C. L. C.;
PESSOA, V. L. R.; BONINI-DOMINGOS, C. R.

Resumo: As talassemias do tipo beta são afecções genéticas frequentes na população mundial e seus portadores podem apresentar elevação nos níveis de hemoglobina A₂ (Hb A₂) e hemoglobina fetal (Hb F). Os objetivos do trabalho consistiram em investigar as frequências dos haplótipos da beta globina e as suas relações com os níveis de Hb F em indivíduos com beta talassemia e sem hemoglobinopatias da Região Sudeste do Brasil. Foram analisadas 150 amostras de indivíduos beta talassêmicos heterozigotos; 22 de indivíduos homozigotos e 150 de indivíduos sem hemoglobinopatias (grupo controle). Todas as amostras foram submetidas aos testes clássicos de diagnóstico de hemoglobinopatias e à análises moleculares por PCR para polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) para a identificação dos sítios de haplótipos da β-globina. Os testes estatísticos foram realizados com o software STATISTICA 8.0 e Haploview 4.2. Nos três grupos foram observados os padrões típicos de haplótipos I, II, IV, VI, VII e IX. Para os indivíduos com beta talassemia heterozigota, os padrões II (24,3%) e VII (32%) foram os mais frequentes; para os indivíduos com beta talassemia homozigota os padrões I (29,5%) e VII (38,6%) e para os indivíduos sem hemoglobinopatias, os padrões de haplótipos I (31%) e VII (28,3%). Houve diferença significativa nos níveis de Hb F entre os indivíduos heterozigotos que apresentaram os padrões de haplótipos I e IV (p=0,007). Ainda em relação aos níveis de Hb F, o haplótipo típico IV esteve relacionado aos maiores níveis nos indivíduos com beta talassemia heterozigota. Os padrões típicos de haplótipos mais observados nos três grupos foram: I, II e VII, o que reflete o perfil genético da nossa população de estudo, revelando origens étnica mediterrâneas e turcas, devido ao intenso processo de miscigenação.

Palavras-chave: beta talassemia; haplótipos β-globina; Hb F.

Introdução:

As talassemias afetam cerca de 7% da população mundial e consistem em um grupo de alterações moleculares causadas pela redução parcial ou total da síntese de uma ou mais cadeias globínicas, resultando em menor produção de Hb A e anemia microcítica e hipocrômica em graus variados^{1,2,3,4}. As talassemias do tipo beta são decorrentes de mutações pontuais, pequenas deleções ou inserção de oligonucleotídeos, sendo que aproximadamente 230 mutações afetando o gene *HBB* foram descritas até o momento, com as maiores prevalências em populações oriundas da Região Mediterrânea e do Sudeste Asiático^{4,5,6,7,8}.

A Hb F é produzida em altos níveis durante o período fetal, devido à expressão dos genes *HBG2* e *HBG1* e por apresentar alta afinidade ao oxigênio, o que é requerido nessa fase do desenvolvimento^{9,10,11}. O aumento de Hb F, induzido, tem efeito benéfico no quadro clínico de homocigotos para a beta talassemia, não apenas por reduzir o desequilíbrio de cadeias do tipo alfa/não alfa, mas também por produzir aumento na síntese de Hb total. Entretanto, os portadores dessa afecção genética diferem em suas capacidades de sintetizar cadeias gama e nos níveis de Hb F^{12,13}. Assim, a maior expressão dos genes *HBG2* e *HBG1* tem relevância clínica no tratamento das doenças relacionadas à beta globina alterada^{11,12,13}.

O tipo de variabilidade mais comum no complexo gênico das globinas α ou β é aquele produzido por polimorfismos em determinadas sequências, sendo que o padrão de combinação desses sítios polimórficos para qualquer cromossomo é chamado de haplótipo^{14,15}. 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^{16,17}.

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^{7,8}. Estudo realizado por Orkin et al em 1982¹⁴, revelou que a frequência individual de cada um dos haplótipos variou de 1% a 47% nos cromossomos de talassêmicos de origem mediterrânea estudados, com o haplótipo I sendo o mais frequente, seguido pelos haplótipos II e V. Objetivamos investigar as frequências dos haplótipos da beta globina e as suas relações com os níveis de Hb F em indivíduos com beta talassemia e sem hemoglobinopatias da Região Sudeste do Brasil.

Material e Métodos: Foram analisadas 322 amostras de sangue periférico, separados em três grupos. 150 indivíduos com beta talassemia heterozigota, 22 indivíduos com beta talassemia homozigota e 150 indivíduos sem hemoglobinopatias (grupo controle). Todas as amostras de sangue foram submetidas a testes clássicos para detecção de hemoglobinopatias como Resistência Globular Osmótica em NaCl 0,36%¹⁸; análise da morfologia eritrocitária a fresco¹⁹; eletroforese em pH alcalino²⁰ e ácido²¹ e ainda quantificação de frações globínicas por HPLC²². Após os três grupos serem separados, foi realizada análise molecular para a genotipagem das mutações de beta talassemia, por PCR Alelo Específico (PCR-AE)²³.

Para a análise dos haplótipos da beta globina, foi realizado PCR para polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP), sendo os sítios e suas enzimas de restrição, respectivamente: γ^G -*Hind*III, γ^A -*Hind*III, $\psi\beta$ -*Hinc*II, 3' $\psi\beta$ -*Hinc*II, β -*Ava* II e 3'*Bam*H I, de acordo com Orkin et al., (1982)¹⁴. Para a análise estatística, utilizou-se o software STATISTICA 8.0, avaliando normalidade (Shapiro Wilk), e homogeneidade das variâncias (Levene). Para analisar os níveis de Hb F em relação aos padrões de haplótipos, utilizou-se Kruskal Wallis complementado por Dunn. O software Haploview 4.2 confirmou a distribuição das frequências dos haplótipos, para essas análises foram avaliados sete sítios polimórficos (polimorfismo *Xmn*I e seis sítios dos haplótipos). E ainda o software R, para relacionar os haplótipos aos níveis de Hb F.

Resultados e Discussão: A análise dos haplótipos da β -globina foi utilizada para identificação da origem desses alelos nos grupos de estudo. Para a determinação dos haplótipos foram analisados seis sítios polimórficos, o que levou a identificação de seis padrões típicos de haplótipos, tanto para indivíduos com beta talassemia heterozigota e homozigota, quanto para indivíduos sem hemoglobinopatias. Para a caracterização dos haplótipos, foram analisados 300 alelos (150 indivíduos) com beta talassemia heterozigota, 44 alelos (22 indivíduos) com beta talassemia homozigota e outros 300 alelos (150 indivíduos) sem alterações de hemoglobinas (grupo controle).

Os padrões observados foram os haplótipos I, II, IV, VI, VII e IX. Os padrões II e VII foram os mais observados nos indivíduos portadores de beta talassemia heterozigota; já para os indivíduos com beta talassemia homozigota e nos sem alterações de hemoglobinas, os padrões I e VII foram os mais observados. As frequências detalhadas são observadas na Tabela 1.

Tabela 1: Frequência dos haplótipos típicos observados em beta talassêmicos heterozigotos, homozigotos e em indivíduos sem hemoglobinopatias (grupo controle).

Haplótipos	I	II	IV	VI	VII	IX	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Beta Tal Hetero	39 13%	90 30%	12 4%	6 2%	117 39%	36 12%	300 100%
Beta Tal Homo	14 33%	4 8%	3 5%	5 10%	17 42%	1 2%	44 100%
Controle	96 32%	45 15%	42 14%	6 2%	87 29%	24 8%	300 100%

Para os beta talassêmicos heterozigotos foram observados 34 alelos (13%) do haplótipo I, 73 alelos (30%) do haplótipo II, 10 alelos (4%) do IV, cinco alelos (2%) do VI, 96 alelos (39%) do VII e 28 (12%) do IX. Esses padrões típicos totalizaram 246 alelos. Os 54 alelos restantes foram considerados padrões atípicos. Nos indivíduos com beta talassemia homozigota foram observados 13 alelos (33%) do haplótipo I, três alelos (8%) do haplótipo II, dois (5%) do IV, quatro (10%) do VI, 17 (42%) do VII e somente um alelo (2%) do haplótipo IX, totalizando 40 alelos. Os quatro alelos restante foram considerados padrões atípicos.

Por fim, para os indivíduos do grupo sem alterações de hemoglobinas foram observados 93 alelos (32%) do haplótipo I, 45 alelos (15%) do haplótipo II, 41 alelos (14%) do IV, seis (2%) do VI, 85 (29%) do VII e 24 (8%) do IX, totalizando 294 alelos; 6 alelos classificados como atípicos. Assim, destaca-se que os padrões típicos mais observados foram o I, II e o VII.

O haplótipo I é de origem mediterrânea e o VII apresenta origem turca, o que sugere que além da grande influência mediterrânea, as populações da região Sudeste do Brasil apresentam em sua composição, forte interferência de outras etnias, como a turca. Para Orkin e colaboradores (1982)⁹ que analisaram indivíduos com beta talassemia da região Mediterrânea, os haplótipos mais observados foram o I (47%) e II (17%). O que reflete a grande influência dessas populações na formação e origem da população brasileira. O haplótipo VII foi observado em apenas 6% dos indivíduos estudados por Orkin e colaboradores (1982)⁹, entretanto em no presente estudo, esse haplótipo foi observado com grande frequência nos três grupos, o que pode refletir uma característica particular da população da região Sudeste do Brasil, devido à intensa miscigenação aqui ocorrida. Estudo realizado por Rahimi e colaboradores (2009)¹⁵, analisando indivíduos beta talassêmicos do Iran revelou que os haplótipos mais observados foram o I (35,7%),

III (28,6%) e o VII (10,2%). Ainda nesse mesmo estudo, indivíduos sem alterações também avaliados, revelaram maior frequência dos haplótipos I (42,9%) e V (14,3%).

Para confirmar as frequências dos haplótipos nos grupos estudados, foi utilizado o software Haploview 4.2, considerando-se apenas os haplótipos com frequência superior a 1%. Foram realizadas quatro análises pareadas, com os três grupos de estudo (indivíduos beta talassêmicos *versus* grupo controle; beta talassêmicos heterozigotos *versus* grupo controle; beta talassêmicos homozigotos *versus* grupo controle e beta talassêmicos heterozigotos *versus* beta talassêmicos homozigotos).

Nas quatro análises foram observados os mesmo padrões de haplótipos: I, II, IV, VI, VII e IX, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2: Resultado da análise dos padrões de haplótipos nos indivíduos com beta talassemia heterozigota, homozigota e sem alterações de hemoglobina, gerado pelo software Haploview 4.2.

Análise	Padrões de Haplótipos	Mais frequentes
Grupo controle X Beta Talassêmicos	I, II, IV, VI, VII e IX	VII (30,3%), I (16%) e II (15,4%)
Grupo controle X B. Tal. Heterozigotos	I, II, IV, VI, VII e IX	VII (30,3%), I (16%) e II (15,4%)
Grupo controle X B. Tal. Homozigotos	I, II, IV, VI, VII e IX	VII (29,1%), I (16%) e IX (13,7%)
B. Tal. Heteroz. X B. Tal. Homoz.	I, II, IV, VI, VII e IX	VII (30,3%), I (16%) e II (15,4%)

As análises por esse programa estatístico, envolveram os três grupos estudados e em todas elas, os padrões de haplótipos mais frequentes foram o I, II e o VII, o que reforça a origem da população da região Sudeste do Brasil, colonizada principalmente por imigrantes italianos e portugueses, no século XIX.

Quando avaliado os níveis de Hb F em relação aos haplótipos para os indivíduos com beta talassemia heterozigota e homozigota, houve diferença significativa somente na análise entre os haplótipos dos indivíduos com beta talassemia heterozigota, a qual foi observada utilizando-se o teste de *Kruskal Wallis* (STATISTICA 8.0), complementado por *Dunn*. Nesse grupo, indivíduos que apresentaram o padrão típico de haplótipo IV, diferiram em relação aos níveis de Hb F do haplótipo típico I ($p=0,007$), como observado na Tabela 3. Para os indivíduos com beta talassemia homozigota, não houve diferença significativa dos níveis de Hb F em relação aos haplótipos avaliados.

Tabela 3: Níveis de Hb fetal (Hb F) em relação aos haplótipos típicos observados em indivíduos com beta talassemia heterozigota, homozigota e indivíduos sem hemoglobinopatias.

Níveis de Hb F (Haplótipos Típicos) *							
Haplótipos	I	II	IV	VI	VII	IX	p
Beta Hetero	0,65±1,00^a	1,2 ±1,20	3,10 ±4,10^b	0,80±0,10	1,10±1,60	1,15±1,25	0,007
Beta Homo	3,00±4,10	1,90±14,20	-	5,25±12,10	3,00±5,50	-	0,27
Controle	0±0,5	0±0	0±0,5	0±0	0,10±0,5	0±0,5	0,29

*Os dados foram expressos em Mediana ± Amplitude Interquartis

a e b: mostra a diferença dos níveis de Hb F entre os padrões de haplótipos. *Teste Kruskal- Wallis*, post hoc *Dunn*.

p: significância do teste estatístico.

Conclusões: Com os resultados desse estudo, pudemos observar seis padrões típicos de haplótipos da beta globina: I, II, IV, VI, VII e IX; sendo que os mais observados, para os indivíduos da Região Sudeste do Brasil foram os haplótipos I, II e VII. Já em relação aos níveis de Hb F com os padrões de haplótipos, os maiores níveis de Hb F foram observados no indivíduos que apresentaram o haplótipo IV.

Referências:

1. WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. **The Thalassaemia Syndromes**. 4th Ed. Oxford: Blackwell Scientific, 2001.
2. BUNN, H.F.; FORGET, B.G. Molecular Genetics and Biosynthesis of Hemoglobin. In: BUNN, H.F.; FORGET, B.G. **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. 1st edition. Philadelphia, P.A, USA, Saunders Company, p. 169-222, 1986.
3. HIGGS, D.R. α -Thalassaemia. In: **Baillière`s Clinical Haematology**. v. 6, n. 1, p. 117-150, 1993.
4. AYDINOK, Y. Thalassemia. **Hematology**, v. 17, suppl. 1, 2012.
5. 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 12 de setembro de 2013.
6. NUSSBAUM, R.L.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F. **Thompson & Thompson: Genética Médica**. 7a ed, Editora Guanabara, Rio de Janeiro, cap. 11, p. 243-264, 2007.
7. CAO, A.; MOI, P.; GALANELLO, R. Recent advances in β -thalassemias. **Pediatric Reports**, v. 3:e17, 2011.

8. MUSOLLINO, G.; MASTROLONARDO, G.; PREZIOSO, R.; et al. Molecular mechanisms of a novel β -thalassaemia mutation due to the duplication of tetranucleotide 'AGCT' at the junction IVS-II/exon 3. **Ann Hematology**, v 91, Issue 11, p 1695-1701, 2012.
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**, v. 72, p. 1854-1860, 1988.
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. **Nat Genet**, v. 39, n. 10, p. 1197-1199, 2007.
11. XU, X.S.; 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**, v. 2, n. 15, p. 1-11, 2009.
12. GALANELLO, R.; CAO, A. Relationship Between Genotype and Phenotype. **Annals New York of Sciences**. v. 850, p. 325-333, 1998.
13. THEIN, S. L. Genetic Modifiers of β -Thalassemia. **Haematologica**. v. 90, p. 649-660, 2005.
14. ORKIN, S.H.; KAZAZIAN JR., H.H.; ANTONARAKIS, S.E.; et al. Linkage of β -thalassaemia mutations and β -globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human β -globin gene cluster. **Nature**. v. 296, p. 627-631, 1982.
15. SUTTON, M.; BOUHASSIRA, E. E.; NAGEL, R.L. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. **American Journal of Hematology**, v. 32, p. 66-69, 1989.
16. WAINSCOAT, J.S.; WORK, S.; SAMPIETRO, M.; et al. Feasibility of prenatal diagnosis of beta thalassaemia by DNA polymorphisms in an Italian population. **British Journal of Haematology**. v. 62, n. 3, p. 495-500, 1986.
17. LONG, J.C.; CHAKRAVARTI, A.; BOEHM, C.D.; et al. Phylogeny of human beta-globin haplotypes and its implications for recent human evolution. **American Journal of Physical Anthropology**. v. 81, n. 1, p. 113-130, 1990.
18. SILVESTRONI, E; BIANCO, I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. **American Journal of Human Genetics**. 1975.
19. BONINI-DOMINGOS, C. R. **Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinopatias e talassemias**. São José do Rio Preto: HN, 2006.

20. MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetato. **Journal of Clinical Pathology**, 1965.
21. VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis oh human hemoglobins. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 49, n. 3, p. 440-442, 1968.
22. BONINI-DOMINGOS, C. R. **Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinopatias e talassemias**. São José do Rio Preto: HN, 2006.
23. BERTHOLO, L. C. **Amplificação gênica alelo específica e multiplex no diagnóstico laboratorial de hemoglobinas anormais**. 2005. 92f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2005.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/_____

Assinatura