



Helena Sofia **Estudo Molecular de Microcitoses Hereditárias com**
Esmeraldo de Campos **Hemoglobina A₂ Normal**
Vazão



**Helena Sofia
Esmeraldo de Campos
Vazão** **Estudo Molecular de Microcitoses Hereditárias com
Hemoglobina A₂ Normal**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica da Doutora Leticia Ribeiro, M.D., Ph.D., Directora do Serviço de Hematologia do Centro Hospitalar de Coimbra e da Doutora Sónia Mendo, Ph.D., Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

UA-SD



253366

o júri

presidente

Prof. Doutor António Carlos Matias Correia
Professor Associado da Universidade de Aveiro

Doutora Maria Leticia de Sousa Ribeiro
Directora do Serviço de Hematologia do Centro Hospitalar de Coimbra

Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Margarida Gama-Carvalho
Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina de Lisboa

agradecimentos

Agradeço à minha Orientadora, Doutora Leticia Ribeiro, todo conhecimento e experiência que me transmitiu, bem como a oportunidade de poder trabalhar nesta área; e à minha Co-orientadora, Dr.^a Sónia Mendo, por toda a ajuda dispensada.

À Celeste Bento, que me acompanhou no desenvolvimento deste trabalho do primeiro ao último dia; por todo o auxílio prestado através dos seus conhecimentos e experiência científica, e ainda pela sua disponibilidade, compreensão e amizade, um eterno OBRIGADA.

A toda a equipa da Unidade de Anemias Congénitas e Hematologia Molecular do Serviço de Hematologia do Centro Hospitalar de Coimbra, e aos internos e estagiários que lá passaram durante este período – pela ajuda directa ou indirecta de cada um e por me proporcionarem um bom ambiente de trabalho, um muito obrigada.

Um agradecimento muito especial ao Professor Douglas Higgs, da Molecular Hematology Unit, Weatherall Institute of Molecular Medicine, Oxford, Reino Unido, e também a todos os que lá tão bem me receberam e ajudaram, especialmente Vip Viprasit, Helena Ayyub e Chris Fisher.

Às omnipresentes Liliana, Fátima e Sónia, simplesmente OBRIGADA!

A todos os que de alguma forma foram indispensáveis, científica e/ou pessoalmente, para a chegada a bom porto deste trabalho aqui deixo expresso o meu maior agradecimento.

E ainda, a Alice e Levy Vazão, meus pais, a quem todos os agradecimentos serão sempre escassos para transmitir a minha gratidão e reconhecimento pelo apoio sempre presente e incondicional. Sem eles a realização deste trabalho não teria sido realmente possível.

palavras-chave

Hipocromia, microcitose, Hb A₂ normal, alfa talassemia, beta talassemia

resumo

Num indivíduo, a observação de parâmetros hematológicos com hipocromia e microcitose com níveis normais de Hb A₂, após exclusão de deficiência de ferro (sideropenia), pode ser devida a uma alteração quantitativa ou qualitativa na síntese dos genes globínicos – alfa-talassemia, algumas variantes de hemoglobina, delta-beta talassemia ou beta-talassemia em associação com delta-talassemia. O diagnóstico diferencial só pode ser feito através de técnicas de biologia molecular. Em Portugal as mutações α -tal mais frequentes são as deleções de 3,7 e 4,2 Kb, estando descritos alguns casos esporádicos de α^0 -tal ($--^{MED}$ e $-(\alpha)^{20.5}$) e mutações não deleccionais. Este estudo teve como objectivo determinar as alterações moleculares responsáveis pela hipocromia e microcitose hereditárias num grupo de indivíduos com Hb A₂ normal, e em que não foram detectadas variantes de Hb por métodos cromatográficos/electroforéticos.

Foram estudadas 57 amostras de indivíduos (adultos e crianças) com Volume Globular Médio (VGM) e Hemoglobina Globular Média (HGM) abaixo dos valores normais para a idade, doseamentos normais de Hb A₂ (<3,5 %) e Hb F (<2%) e com níveis normais de ferro. De acordo com os parâmetros hematológicos, as amostras foram divididas em dois grupos: os que apresentavam valores de VGM e HGM nos limites inferiores dos estabelecidos para a população padrão (Grupo I) e os que apresentavam VGM e HGM mais baixos (Grupo II). Nos dois grupos foram pesquisadas as deleções alfa-talassémicas mais comuns ($-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$; $--^{MED}$ e $-(\alpha)^{20.5}$), utilizando Gap-PCR. Nalgumas amostras pesquisaram-se mutações no gene beta-globínico através de SSCP e sequenciação. As amostras do Grupo II negativas para as deleções alfa-tal mais comuns foram estudadas por outras técnicas: *Southern-blot* e hibridação para testar a presença de grandes deleções nos genes alfa-globínicos e a sequenciação dos mesmos genes para detectar mutações não deleccionais.

No Grupo I, com 34 amostras, 11 eram heterozigóticas $-\alpha^{3.7}$ e 1 heterozigótica $-\alpha^{4.2}$; nas restantes 22 não se encontraram mutações nos genes alfa e beta globínicos. No Grupo II, com 23 amostras, 3 eram homozigóticas $-\alpha^{3.7}$, 1 heterozigótica composta $-\alpha/-\alpha^{4.2}$ e uma heterozigótica $-\alpha^{3.7}$. Um indivíduo era heterozigótico para a variante Hb Plasencia ($\alpha_2(125)CTG \rightarrow CGG$); um heterozigótico para a deleção α_2 -IVSII-1(-G); um duplo heterozigótico para a deleção α_1 (CDs 82-84) /inserção (5 nts) e para uma grande deleção nos

genes α -globínicos. Foi ainda detectado um indivíduo com dupla heterozigotia para as mutações β -IVS-I-1 (G \rightarrow A) e a deleção Corfu delta-7,2 kb no gene δ -globínico, *in trans*. Em 14 amostras não foi identificada qualquer alteração nos genes alfa ou beta.

Como esperado, neste estudo de 57 amostras com hipocromia e microcitose com níveis normais de Hb A₂, a mutação mais comum foi a deleção de 3,7 Kb, nos genes alfa globínicos, no estado heterozigótico e homozigótico. No Grupo II, com valores mais baixos de VGM e HGM, foram encontradas mutações não deleccionais duas das quais não descritas anteriormente: deleção α_2 -IVS-II-1(-G), e deleção (CDs 82-84)/inserção (5 nts) no gene α_1 . O estudo molecular de amostras com parâmetros hematológicos semelhantes aos dos indivíduos incluídos no Grupo I deverá apenas ser realizado para aconselhamento genético. Nas amostras do Grupo II em que não foi detectada qualquer mutação, sugere-se a pesquisa de mutações nos elementos de regulação da expressão dos genes alfa e beta, ou ainda nos factores *trans-acting* eritróides.

keywords

Hypochromic, microcytic, normal Hb A₂ levels, alpha-thalassemia, beta-thalassemia.

abstract

The presence of hypochromia and microcytosis with normal Hb A₂ levels in an individual, after exclusion of iron deficiency, can be due to alpha-thalassemia, some Hb variants, deltabeta-thal or beta-thal in association with delta-thal. Differential diagnosis has to be done by molecular biology techniques. In Portugal the most frequent α^+ -thal mutations are the 3,7 and 4,2 Kb deletions with sporadic cases of α^0 -thal ($--^{MED}$ and $-(\alpha)^{20.5}$) and non-deletional mutations. The aim of this study was to characterise at molecular level a group of samples with hypochromia, microcytosis and normal Hb A₂ levels and no detection of Hb variants by chromatographic/electrophoretic methods.

57 subjects (adults and children) with Mean Corpuscular Volume (MCV) and Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH) below the normal values attending to the age, normal Hb A₂ (<3,5%), Hb F (<2%) and normal iron status were studied. According to the hematological parameters, samples were divided into two groups: those with borderline MCV and MCH values (Group I) and those with lower MCV and MCH (Group II). The two groups were screened for the most common alpha-deletions ($-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $--^{MED}$ and $-(\alpha)^{20.5}$) using Gap-PCR. Beta-globin genes were screened for mutations by SSCP and sequencing. Samples from Group II that tested negative for the common alpha-thal mutations were studied by other techniques: Southern-blot hybridisation was used to test large alpha-globin gene deletions and alpha-globin gene sequencing was used to detect non-deletional mutations.

In Group I, with 34 samples, 11 were heterozygous $-\alpha^{3.7}$ and 1 was heterozygous $-\alpha^{4.2}$; in the remaining 22 samples we could not find any alpha- or beta-globin gene mutations. In Group II, with 23 samples, 3 were homozygous $-\alpha^{3.7}$, 1 compound heterozygous $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ and one heterozygous $-\alpha^{3.7}$. One individual was heterozygous for Hb Plasencia ($\alpha^2(125)CTG \rightarrow CGG$); one was heterozygous for a [α^2 -IVS-II-1(-G)] deletion; one was a compound heterozygous for an α_1 deletion (CDs 82-84) /insertion (5 nts) and a large alpha-globin gene deletion. Beta-gene analysis of remaining samples detected: one β -IVS-I-1 (G \rightarrow A) associated in trans with delta-7.2 kb Corfu deletion. In 14 samples we couldn't identify any alpha- or beta- alteration.

As expected, in this study of 57 samples with hypochromia and microcytosis with normal Hb A₂ levels the most common mutation found was the - $\alpha^{3.7}$ Kb deletion, in heterozygous and homozygous state. In group II, with lower MCV and MCH values, two mutations not previously described were found: α_2 -IVS-II-1(-G) deletion and α_1 deletion (CDs 82-84) /insertion (5 nts). The molecular study of samples as Group I individuals should only be done in genetic counselling cases. When no mutations were detected in Group II we suggest looking for mutations in the alpha and beta genes expression regulatory elements or in erytroid trans-acting factors mutations.

Índice

Lista de símbolos e abreviaturas	v
I-Introdução	1
1. Hemoglobinopatias	2
1.1. Hemoglobina	2
1.2. Distribuição geográfica	3
2. Organização dos <i>clusters</i> de genes α - e β -globínicos (<i>HBA</i> e <i>HBB</i>)	5
3. Bases moleculares das hemoglobinopatias	11
3.1. Bases moleculares da β -talassemia	11
3.1.1. Mutações que afectam a transcrição	11
3.1.2. Mutações que afectam o <i>splicing</i> do mRNA	13
3.1.3. Mutações que afectam a tradução	14
3.1.4. Clivagem do RNA e mutações no local de <i>poly A</i>	15
3.1.5. β -talassemias intermédias de transmissão dominante e cadeias β -globínicas instáveis	15
3.1.6. β^0 -Talassemia deletional	16
3.1.7. Mosaicismo devido a deleção somática no gene β -globínico	16
3.2. Bases moleculares da δ -talassemia	17
3.3. Bases moleculares da α -talassemia	17
3.3.1. α -Talassemia deletional	18
3.3.1.1. Deleções que removem parte ou a totalidade do <i>cluster</i> de genes α -globínicos (α^0 -tal)	18
3.3.1.2. Deleções que removem um dos dois genes α -globínicos (α^+ -tal)	20
3.3.2. α -Talassemia não deletional	22
3.3.3. Síndrome ATR-X	24
3.4. Bases moleculares das variantes de Hemoglobinas	24
3.4.1. Hemoglobinas com uma ou duas substituições de aminoácidos	25
3.4.2. Hemoglobinas com cadeias híbridas	27
3.4.3. Hemoglobinas com cadeias α ou β alongadas	27

3.4.4.	Hemoglobinas com deleções e/ou inserções nos genes α ou β -globínicos	28
4.	AHSP (Proteína estabilizadora das cadeias α)	28
5.	Mutações no gene <i>DMT1</i> (Transportador de metais divalente)	29
6.	Características clínicas e hematológicas	31
6.1.	α -Talassemia	31
6.1.1.	α^+ -Tal	31
6.1.2.	α^0 -Tal	32
6.1.3.	Doença da Hb H	32
6.1.4.	Hb Bart's <i>hydropsis fetalis</i>	33
6.2.	β -Talassemia.	33
6.2.1.	β -Tal <i>minor</i>	33
6.2.2.	β -Tal <i>major</i>	34
6.2.3.	β -Tal intermédia	35
6.3.	Variantes de Hemoglobina	36
6.3.1.	Drepanocitose	36
6.3.2.	Variantes de Hemoglobina Talassémicas	37
7.	Significância deste estudo	39
8.	Objectivos deste trabalho	39
II - Material e métodos		40
1.	Amostras	41
1.1.	Seleção das amostras a estudar	41
1.2.	Colheita de sangue e parâmetros determinados	41
2.	Estudos moleculares	42
2.1.	Extracção de DNA genómico	42
2.1.1.	Extracção de DNA de amostras de sangue pelo método fenol- clorofórmio	42
	Protocolo de extracção de DNA por fenol	42
	Protocolo de Fenol Saturado em Tris	43
2.1.2.	Extracção de DNA de amostras de sangue por <i>kit</i> comercial	44

2.2. Amplificação de DNA pelo método da <i>Polimerase Chain Reaction</i> (PCR)	44
2.2.1. PCR <i>Multiplex</i>	45
2.2.2. Amplificação dos genes globínicos α_1 e α_2	47
2.2.3. Amplificação do gene β -globínico	47
2.2.4. Amplificação do gene δ -globínico	48
2.2.5. Pesquisa da deleção Corfu de 7,2 Kb	49
2.3. Electroforese convencional dos produtos de PCR em gel de agarose	50
2.4. <i>Single Stranded Conformational Polymorphism</i> (SSCP)	51
Protocolo do SSCP	51
I - Preparação do gel de separação	51
II - Preparação do gel de empacamento	52
III - Preparação das amostras	53
IV – Electroforese	53
V – Coloração de <i>silver staining</i>	53
2.5. Mapeamento genético do <i>cluster</i> de genes α -globínicos	54
I. Digestão enzimática do DNA genómico, electroforese e <i>Southern blot</i>	54
II. Endonucleases de restrição e sondas de DNA	54
III. Marcação radioactiva das sondas	55
IV. Pré-hibridação da membrana	56
V. Hibridação da membrana	56
VI. Lavagem e autoradiografia da membrana	56
2.6. Sequenciação do DNA amplificado por PCR	57
I- Purificação de PCR – EXOSAP-IT	57
II- Reacção de Sequenciação	57
III- Reacção de precipitação, Clean-up Big-Dye	60
IV- Ressuspensão em TSR - <i>template suspension reagent</i>	61
2.7. Digestão do DNA genómico com enzimas de restrição	62
Protocolo	62
2.8. Síntese de cadeias globínicas: estudo <i>in vitro</i>	63
Princípio	63
Protocolo	63

III-Resultados	65
1. Pesquisa das deleções mais comuns nos genes α -globínicos	67
2. Pesquisa de mutações pontuais nos genes β -globínicos	69
3. Pesquisa de mutações nos genes δ -globínicos	71
4. Pesquisa de grandes deleções no <i>cluster</i> de genes α -globínicos	73
5. Pesquisa de mutações não deleccionais nos genes α -globínicos	76
6. Determinação do rácio de cadeias α/β globínicas	80
IV-Discussão	81
V-Referências Bibliográficas	93

Lista de Símbolos e Abreviaturas

A	adenina
AgNO ₃	nitrato de prata
AHSP	<i>alpha hemoglobin stabilizing protein</i> – proteína estabilizadora das cadeias α
Ala	alanina
Arg	arginina
Asn	asparagina
Asp	ácido aspartico
BSA	<i>bovine serum albumin</i> – albumina sérica bovina
C	citosina
CD	codão
Cys	cisteína
D	<i>primer</i> directo
dL	decilitro
DMT1	<i>divalent metal transporter</i> – transportador de metais divalente
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> - ácido desoxirribonucleico
dNTP	<i>deoxy nucleotide triphosphate</i> – desoxinucleótido trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
fL	fentolitros
g	grama
G	guanina
G-50	sephadex G50
Glu	glutamina
Gly	glicina
h	hora
Hb	hemoglobina
HGM	hemoglobina globular média
HS DNase I	<i>hypersensitive site</i> – local hipersensível da DNase I
HS-40	<i>hypersensitive site 40</i> (região de controlo do gene <i>HBA</i>)
HVR	<i>hypervariable region</i> – região hipervariável
His	histidina
H ₂ O _d	água destilada
H ₂ O _{dd}	água duplamente destilada
Ile	isoleucina
IVS	<i>intervening sequence</i> – sequência intrónica
IVS-I	primeira sequência intrónica

IVS-II	segunda sequência intrónica
Kb	kilobases
L	litro
LCR	<i>locus control region</i> – região de controlo
Lys	lisina
M	molar
Met	metionina
MCH	<i>mean corpuscular hemoglobin</i> – hemoglobina globular média
MCV	<i>mean corpuscular volume</i> – volume globular médio
mg	miligrama
min	minutos
ml	militros
mM	milimolar
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> – ácido ribonucleico mensageiro
NaAc	acetato de sódio
NaCl	hidróxido de sódio
ng	nanogramas
NP-40	nonidet P-40
nt	nucleótido
ON	<i>overnight</i>
pb	pares de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> – reacção em cadeia da polimerase
pg	picogramas
Phe	fenilalanina
Pro	prolina
PSA	persulfato amónio
R	<i>primer</i> reverso
rpm	rotações por minuto
RNA	<i>ribonucleic acid</i> – ácido ribonucleico
SDS	<i>sodium dodecil sulphate</i> – dodecil sulfato de sódio
seg	segundos
Ser	serina
SSC	solução de citrato de sódio
ssDNA	molécula de DNA em cadeia simples
SSDNA	DNA de esperma de salmão
T	timina
TAE	tris acetato EDTA
Tal	talassemia
TBE	tris borato EDTA

TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
Thr	treonina
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
Trp	triptofano
Tyr	tirosina
U	unidades
UTR	<i>untranslated region</i> – região não traduzida nos terminais do mRNA
UV	ultra-violeta
VGM	volume globular médio
μl	microlitros
μCi	microcurie
μM	micromolar
°C	graus Celcius

I – Introdução

I – Introdução

1. Hemoglobinopatias

1.1. Hemoglobina

A principal função dos glóbulos vermelhos nos humanos e outros vertebrados é o transporte de oxigénio e a remoção do CO₂. Esta função é dependente da molécula transportadora de oxigénio, a proteína hemoglobina (Hb), que constitui mais de 90% das proteínas solúveis nesta célula. A molécula de hemoglobina é um tetrâmero composto por dois pares de cadeias globínicas (duas cadeias alfa (α) ou do tipo α e duas cadeias não α), e um grupo hémico, a ferroprotoporfirina IX, ligado covalentemente a cada uma das quatro cadeias globínicas através de um resíduo específico de histidina. O grupo heme-Fe⁺⁺ permite a ligação reversível de oxigénio. As interacções alostéricas entre as quatro cadeias globínicas resultam numa curva fisiológica sigmóide de ligação de oxigénio e permitem um ajuste adequado da afinidade da ligação do oxigénio em relação ao pH, temperatura, pCO₂ e níveis de fosfatos orgânicos (2,3-DPG) específicos de cada tecido. O funcionamento do glóbulo vermelho depende em grande parte da síntese equilibrada de cadeias globínicas do tipo α e não α , e da correcta formação do tetrâmero funcional de hemoglobina. No indivíduo adulto a Hb A ($\alpha_2\beta_2$) representa cerca de 95 a 98% da hemoglobina total, encontrando-se também pequenas quantidades de Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) e de Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) [1].

As hemoglobinopatias são definidas como desordens genéticas em que devido a alterações moleculares em um ou mais genes globínicos, há uma redução ou ausência de síntese das cadeias globínicas normais, dando origem às talassemias; ou à síntese de uma cadeia globínica estruturalmente anormal, de que resultam variantes de Hb.

As talassemias são classificadas em alfa, gama, delta ou beta-talasseмии em função da produção deficiente de cadeias α , γ , δ , ou β -globínicas, respectivamente [2].

O quadro clínico dos síndromas talassémicos vai desde o estado de portador assintomático (α - e β -talassemia *minor*), a formas intermédias (β -talassemia intermédia e

doença da Hb H), até às formas mais severas (β -talassemia *major* e Hb Bart's- *hydropsis fetalis*). Os doentes com β -talassemia *major* são dependentes de transfusões sanguíneas desde o primeiro ano de vida, e mesmo com um adequado regime transfusional, a maioria morre na segunda ou terceira década de vida por complicações relacionadas com a sobrecarga de ferro [3]. A Hb Bart's- *hydropsis fetalis* é incompatível com a vida, porque não havendo síntese de cadeias α só são produzidas hemoglobinas embrionárias e tetrâmeros de cadeias γ (γ_4 - Hb Bart's) e β (β_4 - Hb H).

O diagnóstico das hemoglobinopatias tem como principal objectivo a prevenção das formas severas, com o aconselhamento genético e o diagnóstico pré-natal. O desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, como o transplante de medula óssea, a terapia genética e a indução farmacológica da síntese de Hb F, abre novas perspectivas no tratamento destes doentes.

1.2. Distribuição geográfica

As hemoglobinopatias são as doenças monogénicas mais comuns na população mundial [3], com elevada frequência nas populações com origem no Mediterrâneo, África, Médio Oriente, Índia e Sudeste Asiático. A Organização Mundial de Saúde estima que existem pelo menos 270 milhões de heterozigóticos no mundo, e que em cada ano nascem mais de 300 000 homozigóticos severamente afectados [4], traduzindo-se num grave problema de saúde pública, que é agravado pelo facto das prevalências mais elevadas serem em países com baixos níveis sócio-económicos. A elevada frequência genética das hemoglobinopatias resulta de uma vantagem selectiva da grande maioria dos heterozigóticos, cujos eritrócitos são mais resistentes à malária [5].

A β -talassemia é a doença genética mais comum nos países mediterrânicos, com frequências na ordem dos 5 a 20% [6]. Na Península Ibérica a frequência dos alelos de β -talassemia é heterogénea, mas mais elevada no Sul [7-8]. A prevalência da α -talassemia é subestimada devido às suas características e porque o diagnóstico necessita do recurso a técnicas de biologia molecular; alguns estudos populacionais mostram que atinge uma incidência de aproximadamente 5% na Sardenha e Grécia, e de 20% no Chipre [9]. A α -talassemia é também comum nos africanos; aproximadamente 25 a 30% são portadores

silenciosos. No Sudeste Asiático, as α - e β -talassemias têm frequências semelhantes, aproximadamente 5% [9]; atingindo a α talassemia uma incidência de 15% na província de Guangxi, China [10], 20% na Tailândia e 80% na Nova Guiné.

As variantes de hemoglobina têm sido encontradas em praticamente todos os grupos étnicos, mas ocorrem mais frequentemente em populações da Bacia do Mediterrâneo, África, Médio Oriente, Sub-continentes Indiano e Sudeste Asiático. A Hb S é particularmente comum nos africanos: na África Central a frequência de heterozigóticos é de cerca de 20%, atingindo os 40% em algumas áreas [11]. Nos Negros Americanos a incidência é de cerca de 8%. A Hb E, a segunda variante mais comum, é encontrada principalmente na Birmânia, Tailândia, Laos, Cambodja, Malásia e Indonésia, onde a frequência de portadores atinge os 30% em algumas zonas [12]. Na China as variantes de Hb têm uma incidência de 0,3%, atingindo os 6,0% na Província de Yunnan. As Hbs E, New York, G-Chinese, Q-Thailand e J-Bangkok são maioritariamente prevalentes no sul da China [10].

Embora em homozigotia as hemoglobinopatias estejam associadas a fenótipos graves ou mesmo incompatíveis com a vida, a elevada frequência genética em algumas populações sugere que o estado de portador está associado a uma vantagem sobre os não portadores, nomeadamente na resistência à malária [13-14]. Muitos estudos têm sido feitos para testar esta hipótese e várias experiências sugerem que a protecção pode ter mediação imune [15], sendo as células talassémicas infectadas mais susceptíveis à digestão pelos macrófagos [16]. Está também demonstrado que crianças heterozigóticas para a Hb S, aquando de uma infecção com *Plasmodium falciparum* têm manifestações mais suaves da doença do que as crianças com Hb normal. Nas células parasitadas existe uma diminuição do pH intracelular que favorece a polimerização da Hb S. A redução do potássio intracelular, que acompanha a polimerização, parece ser letal para o parasita [17].

2. Organização dos *clusters* de genes α - e β -globínicos (*HBA* e *HBB*)

Diferentes tipos de Hb são sintetizados em todos os estádios do desenvolvimento (embrionário, fetal e adulto), de acordo com necessidades particulares de oxigénio em cada ambiente específico. Todos os tipos de Hb são tetrâmeros de duas cadeias globínicas idênticas, tipo- α e não α , cada uma com um grupo heme. As Hbs embrionárias, Gower-I ($\xi_2\varepsilon_2$), Gower-II ($\alpha_2\varepsilon_2$), Portland-I ($\xi_2\gamma_2$), Portland-II ($\xi_2\beta_2$) e Portland-III ($\xi_2\delta_2$), são produzidas no saco vitelino durante a 3^a à 8^a semana de gestação (figura I.1). As duas Hbs fetais ($\alpha_2^G\gamma_2$ e $\alpha_2^A\gamma_2$), que apenas diferem entre si no aminoácido da posição 136, são produzidas predominantemente da 8^a à 28^a semana, quando o fígado se torna o local de maior eritropoiese. A síntese das duas Hbs adultas, Hb A ($\alpha_2\beta_2$) e Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$), inicia-se no feto durante o 2^o trimestre de vida fetal, e os seus níveis vão aumentando. Ao nascimento, a Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) constitui mais de 80% da Hb e o rácio das cadeias $G\gamma/A\gamma$ é de 3:1 [18]. O nível de Hb F diminui drasticamente nos primeiros seis meses de vida extra-uterina, o rácio $G\gamma/A\gamma$ diminui para os níveis do adulto em 3-4 meses, que é de 2:3. Cerca de 20-30% das crianças mantêm uma percentagem relativa de $G\gamma$ de 60-70% e de $A\gamma$ de 30-40%, devido a polimorfismos na região promotora do gene $G\gamma$ que aparentemente aumentam a produção das cadeias $G\gamma$. Destes polimorfismos os mais frequentes são a alteração -158 (C→T) (designado *XmnI*, por ser reconhecido por esta enzima de restrição) e a -161 (G→A) [19].

A Hb predominante no adulto é a Hb A, apenas cerca de $2,6 \pm 0,3\%$ é Hb A₂ e uma pequena quantidade (<1%) é Hb F [20]. Os níveis de Hb A₂ estão ligeiramente aumentados (3,5 - 9 %) em indivíduos heterozigóticos para o alelo β -talassemia (β -tal). Os valores mais altos foram encontrados em heterozigóticos β -tal com deleções ou mutações pontuais envolvendo a região promotora do gene β .

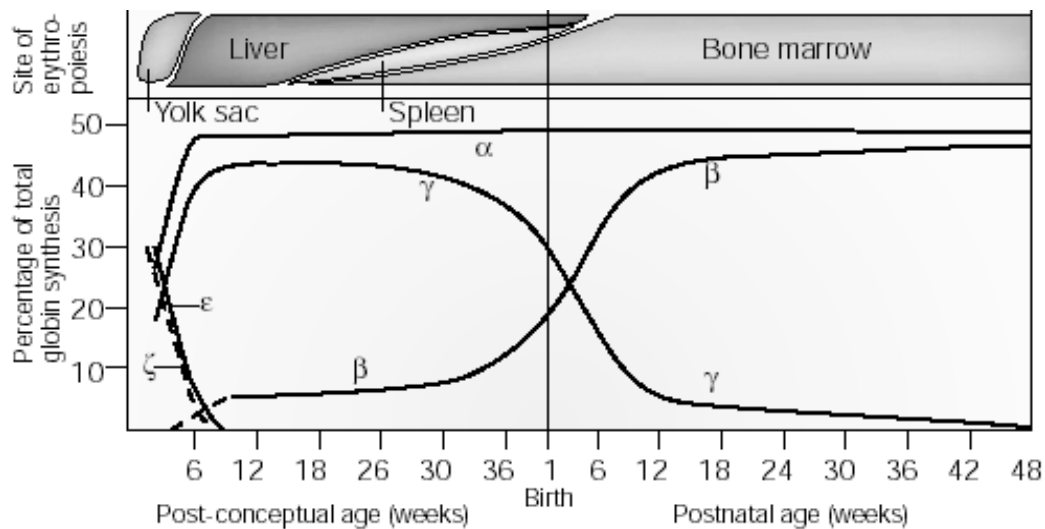


Figura I.1. Estão representados os diferentes tipos de Hbs predominantes durante o desenvolvimento, desde o estado embrionário ao estado adulto. As Hbs embrionárias, Gower-I ($\xi_2\varepsilon_2$), Gower-II ($\alpha_2\varepsilon_2$), Portland-I ($\xi_2\gamma_2$), Portland-II ($\xi_2\beta_2$) e Portland-III ($\xi_2\delta_2$), são restritas à fase de desenvolvimento no saco vitelino. As duas Hbs fetais ($\alpha_2^G\gamma_2$ e $\alpha_2^A\gamma_2$), são predominantes a partir da oitava semana de vida fetal. No indivíduo adulto a Hb A ($\alpha_2\beta_2$) representa cerca de 95 a 98% da hemoglobina total, encontrando-se também pequenas quantidades de Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) e Hb F ($\alpha_2\gamma_2$). (Adaptado de Weatherall *et al* (1991) [21]).

Os genes que codificam as cadeias globínicas α e não α estão organizados em dois pequenos *clusters* em diferentes cromossomas (16 e 11, respectivamente), que provavelmente derivaram de um único gene ancestral há cerca de 450 milhões de anos [21]. Em cada *cluster* os genes estão organizados de 5' para 3' na mesma ordem por que são expressos durante o desenvolvimento. Os pares de genes que são expressos no mesmo período do desenvolvimento de um indivíduo estão próximos um do outro, como é o caso dos dois genes α , dos genes δ e β e dos genes $^G\gamma$ e $^A\gamma$.

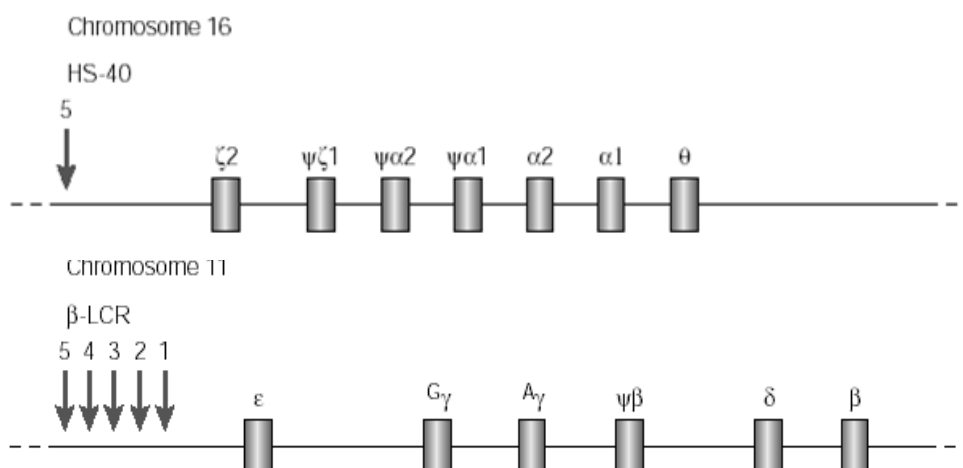


Figura I.2. Esquema dos *clusters* de genes α - (cromossoma 16) e β - globínicos (cromossoma 11). Estão representados os genes, pseudogenes e as regiões de controlo HS-40 (α) e LCR (β). (Adaptado de Weatherall *et al* (2001) [22]).

O *cluster* β -globínico (não alfa), que abrange uma região de aproximadamente 60 Kb no braço curto do cromossoma #11, tem 5 genes funcionais (ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ , β) e um pseudogene ($\psi\beta$) (figura I.2). As cadeias polipeptídicas sintetizadas pelos dois genes γ diferem em apenas um aminoácido na posição 136: a cadeia $G\gamma$ tem glicina, enquanto que a cadeia $A\gamma$ tem alanina. As cadeias δ e β também são similares entre si, diferindo apenas em 10 aminoácidos [23].

Nos genes do *cluster* β -globínico, que consistem em três exões separados por dois intrões, as regiões codificantes (exões) têm uma homologia significativa na sua sequência de nucleótidos. O tamanho dos intrões também é bastante semelhante, variando de 122 a 130 nucleótidos no intrão #1, e de 850 a 904 nts no intrão #2. As sequências intrónicas, nomeadamente a IVS-II, diferem consideravelmente, excepto no caso dos genes gama G ($G\gamma$) e gama A ($A\gamma$) [23].

O LCR (região de controlo) do gene β -globínico é constituído por 5 locais hipersensíveis da DNase I (HS DNase I). Cada um dos 5 locais (HS 1-5) consiste em segmentos de DNA de 200 a 300 pb contendo locais de ligação para uma variedade de factores *trans-acting* eritróides e ubíquos [24-26], que se julga terem uma actividade cooperativa nas suas ligações. O LCR parece afectar a organização cromatínica do *cluster* de genes β -globínicos [27], e regular a transcrição sequencial de cada gene durante a

ontogénese [28]. Vassilopoulos e colaboradores (1999) [29], propõem que a activação do LCR se dá mediante um processo com várias etapas, que se inicia com a ligação precoce de factores de transcrição ubíquos no processo de diferenciação das células hematopoiéticas e termina com a ligação de factores eritróides nos progenitores eritróides. O LCR desempenha um papel crítico na expressão do gene β -globínico ao manter a cromatina num estado aberto e actuando como um activador poderoso na transcrição do gene; na sua ausência, o nível de expressão é baixo. Quatro dos locais (HS 1-4) são específicos das células eritróides, delimitando sequências de ligação para factores de transcrição eritróides (GAT-1 e NF-E2), enquanto que o HS 5 é ubíquo [30].

O **cluster α -globínico** abrange cerca de 50 Kb no braço curto do cromossoma #16, 170 a 430 Kb a partir do telómero, e possui três genes funcionais (ξ_2 , α_2 , α_1), três pseudogenes ($\psi\xi$, $\psi\alpha_2$, $\psi\alpha_1$), e um gene com função não determinada (θ_1) (figura I.2). Os pseudogenes têm sequências que se assemelham aos genes funcionais, mas diferem nas regiões codificantes ou de controlo crítico, o que impede a sua expressão. Todos os genes do tipo α têm um elevado conteúdo em guanina e citosina, e as regiões codificantes consistem em três exões que estão separadas por dois intrões. Os genes funcionais α e ξ apresentam apenas 58% de homologia nos seus 141 codões, enquanto que os genes α_1 e α_2 são altamente homólogos, codificam proteínas idênticas e diferem apenas na IVS-II e nas regiões 3' transcritas mas não traduzidas (3'UTR) [31]. O segundo intrão do gene α_1 possui mais 9 bases e difere em três bases em relação ao do α_2 [32]. A diferença na 3'UTR (13 bases além do codão *Stop*) parece ser importante na regulação da transcrição [33]. Baseado na quantificação do mRNA [34] foi calculado que o gene α_2 sintetiza 2 a 3 vezes mais cadeias α que o gene α_1 ; no entanto, estudos posteriores sugerem que o gene α_2 tem uma transcrição 2,5 a 3 vezes mais elevada, mas que o gene α_1 tem 2,5 a 3 vezes mais eficiência na tradução, resultando numa síntese equilibrada das cadeias α -globínicas pelos dois genes [35]. Higgs, D.R. (2001) [36] afirma que o gene α_1 controla apenas um quarto da expressão total da α -globina.

O *cluster* de genes do tipo α é altamente polimórfico, com muitas mutações pontuais e rearranjos que não têm efeito aparente na expressão dos genes [37]. Várias regiões do *cluster* contêm segmentos de DNA repetidos em série (minisatélites). Possui

também 5 regiões hipervariáveis, uma a jusante do gene α_1 (3'HVR α -globínica) [38], uma entre os genes ξ_2 e $\psi\xi_1$ (HVR interzeta), uma no primeiro intrão de ambos os genes ξ (HVR's ξ -intrão) e uma a 5' do *cluster* (5'HVR α -globínica) [39] (figura I.3). As sequências minissatélites parecem ser frequentes junto aos telômeros dos cromossomas humanos [40].

Foi demonstrado que a expressão dos genes α -globínicos é dependente de um elemento regulatório a montante, o HS-40, localizado 40 Kb a 5' do gene ξ e associado a uma HS DNase I específica eritróide [41]. Esta região regulatória consiste num segmento com 200-300 pb, numa região de cromatina aberta quer em células eritróides quer em não eritróides; e contém locais de ligação para uma variedade de factores *trans-acting* eritróides (GATA-1 e NF-E2) [42-43] e ubíquos [25, 44].

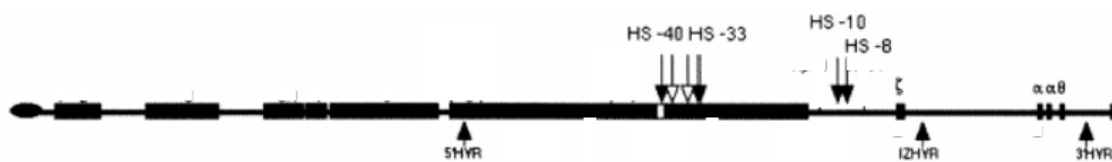


Figura I.3. Esquema do *cluster* de genes α -globínicos com a localização relativa de 5', interzeta (IZ) e 3' HVR e dos elementos regulatórios HS-40, HS-33, HS-10, HS-8. (Adaptado de Viprakasit *et al* (2003) [45]).

A transcrição precisa e eficiente dos genes α e não α pela Polimerase II do RNA é dependente da região promotora, cerca de 100 nucleótidos a 5' do local de iniciação da transcrição. Essa região contém três conjuntos de sequências nucleotídicas evolutivamente conservadas que são comuns a todos os genes globínicos – ATAAA (caixa TATA), CCAAT (caixa CAT) e CACCC (caixa CAC) [46].

O promotor do gene β -globínico contém duas caixas CAC localizadas entre os nucleótidos 80-100 a 5' do *Cap site*. Estas caixas também estão presentes nos promotores dos genes ε e γ . No promotor do gene δ -globínico a sequência CCAAT, presente em todos os genes globínicos do tipo β , é alterada para CCAAC; a distância entre a CCAAT e a caixa TATA é diferente da observada nos promotores dos genes β e γ , e não tem a caixa

distal CAC [47]. Experiências *in vitro* demonstraram que a baixa taxa de síntese das cadeias δ -globínicas [48] é devida à região promotora do gene δ -globínico ser muito menos eficiente do que a promotora do gene β , assim como as sequências potenciadoras da transcrição, *enhancers*, localizadas na IVS-II.

Os genes β -globínicos têm um ou mais activadores que parecem contribuir para uma regulação positiva da expressão genética, independentemente da distância ou da orientação relativamente ao gene alvo [49]. São sequências de ligação para vários factores de regulação específicos (Sp 1, GATA, NFE-2) e parecem estar envolvidos em estadios de expressão específica de genes individuais. Nos genes β -globínicos foram descritos um *enhancer* intragénico na região próxima à junção do intrão 2 e exão 3 e um *enhancer* a jusante do gene [50]. Foi identificado também um elemento *silenciador* entre -182 e -467 pb a montante do gene ϵ [51]. Este elemento é necessário para uma regulação adequada da expressão do gene ϵ -globínico durante o desenvolvimento e é silenciado durante a transição da expressão embrionária para a fetal. Foi sugerido que um motivo repetido $(AT)_x(T)_y$ encontrado na região 5' do gene β , liga a proteína Bp1, que se acredita ser um factor *trans-acting* de regulação negativa [51].

As sequências intrónicas dos genes globínicos, transcritas em mRNA precursor, são subsequentemente excisadas e os terminais das sequências codificantes são unidos. Este processo, chamado *splicing* do RNA, requer sequências nucleotídicas específicas nas junções entre os exões e os intrões. Estas sequências críticas têm sempre os dinucleótidos GT no terminal 5' e AG no terminal 3' dos intrões, juntos com as sequências consenso envolventes. A sequência consenso do 5' ou local *splice donor* inclui os últimos 3 nucleótidos do exão e os primeiros 6 nucleótidos do intrão, enquanto que o local 3' ou *acceptor* contém os 10 últimos nucleótidos do intrão e o primeiro nucleótido do exão [9].

O transcrito dos genes globínicos inclui as regiões codificantes e sequências adicionais nos dois terminais do mRNA, conhecidos como UTRs. Após a transcrição são adicionados outros nucleótidos; ao terminal 5' é adicionado um ácido guanílico metilado (estrutura Cap), e ao terminal 3' um número de resíduos adenílico-acídicos que formam a cauda *poly A*. O *Cap site* (local Cap) é importante para a iniciação da síntese da cadeia globínica e a cauda de *poly A* estabiliza o mRNA. O hexanucleótido AAUAAA, localizado

aproximadamente a 20 nucleótidos a 3' da cauda *poly A*, é o sinal necessário ao processamento e poliadenilação do transcrito [46].

3. Bases moleculares das hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias resultam de um grande número de diferentes tipos de mutações e deleções nos genes globínicos, no entanto, este grupo heterogéneo de genótipos está associado a um número muito menor de fenótipos, cada um com características razoavelmente homogéneas.

3.1. Bases moleculares da β -talassemia

Molecularmente a β -tal é heterogénea, com cerca de 233 mutações e deleções descritas até à data [52-53].

Mutações no gene β -globínico podem resultar em diminuição da transcrição do DNA, alterações no processamento (*splicing*, poliadenilação) ou na tradução do mRNA, ou dar origem a genes que codifiquem para cadeias globínicas muito instáveis. Deste modo podem levar a uma diminuição (mutações β^+ -tal) ou ausência total de produção de cadeias β -globínicas (mutações β^0 -tal) ou à formação de cadeias variantes (mutações β^{var}). A maioria das mutações são pontuais, há algumas inserções ou deleções de um pequeno número de nucleótidos e as grandes deleções são raras.

3.1.1. Mutações que afectam a transcrição

Os defeitos na transcrição do gene β -globínico estão associados a mutações em alguns elementos regulatórios, tais como as caixas TATA, CAC e CAT, na região promotora. Substituições de nucleótidos nestas regiões conservadas resultam numa redução da transcrição e numa mutação β^+ -tal com fenótipo suave, que tem alguma heterogeneidade dependente da importância que cada elemento regulatório tem na transcrição.

Foram descritas várias mutações diferentes em cinco posições da caixa TATA (ATAAA), entre as posições -28 e -32 relativamente ao Cap *site*. A mutação -29 (A→G) é a mais frequente entre a população negra, estando associada ao polimorfismo *Xmn I* (+) do gene $\text{G}\gamma$ [54]. Os homozigóticos têm talassemia intermédia suave com níveis de Hb 9-10 g/dL e mais de 60% de Hb F [55]. Na população chinesa a mutação -29 (A→G) está *in cis* com o polimorfismo $\text{G}\gamma$ *Xmn I* (-). Foi descrita num indivíduo Chinês, uma homozigotia para esta mutação, apresentando um fenótipo de β -talassemia *major* dependente de transfusões [56]. A mutação -88 (C→T), segunda mais frequente entre os negros, está também localizada na região promotora, num cromossoma *Xmn I* (+) [54-55].

Foram identificadas nove mutações na caixa CAC (CACCC) proximal em associação com fenótipos suaves. É interessante notar que ao contrário de outras mutações β -tal suaves, estas estão associadas com níveis elevados de Hb A₂ nos heterozigóticos; aparentemente porque alteram a ligação de factores de transcrição levando a um aumento da transcrição do gene δ -globínico *in cis* [57]. A mutação -90 (C→T), descrita inicialmente numa família Portuguesa [58], é associada com um fenótipo de β -tal intermédia suave no estado homozigótico [59].

Foi encontrada apenas uma mutação na caixa CAC distal, -101 (C→T). Os heterozigóticos têm um fenótipo β -tal “silencioso”, com parâmetros hematológicos normais e Hb A₂ normal a ligeiramente aumentada. A combinação de um alelo com esta mutação e um alelo β^0 ou β^+ , resulta num fenótipo de talassemia intermédia relativamente suave. Estudos funcionais *in vitro* demonstraram um efeito negativo da mutação na eficiência da actividade transcricional [60-61]. Outras experiências mostraram a ligação de factores específicos eritróides a um fragmento do promotor do gene β -globínico humano que inclui a sequência CAC distal (nt -128 a -98) [62]. Estes trabalhos apoiam a possibilidade da caixa CAC distal estar envolvida na regulação da expressão específica eritróide do gene β -globínico. Este papel é provavelmente menos importante do que o da caixa CAC proximal, como pode ser deduzido do fenótipo dos portadores e de dados de experiências *in vitro* [60]. A mutação -101 (C→T) é uma causa relativamente frequente da β -tal no mediterrâneo; vários estudos demonstraram uma deficiência mais severa na produção da cadeia β -globínica na infância do que no adulto [63].

O primeiro nucleótido do transcrito (+1), o Cap *site*, está localizado 50 nucleótidos a 5' do codão (CD) de iniciação ATG (metionina); uma mutação neste local pode ter efeito

na transcrição ou no *capping*, com um efeito secundário na tradução. Foi descrito um indivíduo Indiano-Asiático, homozigótico para a mutação pontual +1 (A→C), com um fenótipo de β -tal intermédia [64].

As β -tal associadas a mutações na região promotora do gene β -globínico confirmam a importância das sequências conservadas na regulação da transcrição, como motivos de ligação para factores *trans-acting*, e formam a base para algumas das formas mais suaves de β -tal.

3.1.2. Mutações que afectam o *splicing* do mRNA

As mutações que afectam os dinucleótidos conservados GT (no local de *donor splice*) ou no AG (no local de *acceptor splice*) eliminam o *splicing* no transcrito de RNA nessa posição, inibindo a produção de polipeptídeos β normais. A alteração (G→A) no IVS-I-1 é uma das mutações mais comuns na área Mediterrânica. No local *donor splice* do IVS-II foi encontrada apenas uma mutação, IVS-II-1 (G→A), o local *donor* alternativo está localizado 47 nucleótidos a jusante [65]. As mutações no local de *splice acceptor* IVS-II activam um *splice acceptor* crítico a montante, na posição 579 no IVS-II [66].

A mutação IVS-I-6 (T→C), uma mutação β -tal mediterrânica comum, resulta numa β^+ -tal suave, porque permite ainda a síntese de um número substancial de transcritos com um *splicing* correcto. Os homozigóticos têm um fenótipo de β -tal intermédia moderada que é conhecida como o “tipo Português” [67-69]. As substituições de nucleótidos na posição precedente, IVS-I-5 (G→C, ou T ou A), resultam em β^0 -tal com fenótipo severo.

As substituições de nucleótidos em algumas regiões do gene β -globínico aumentam a similaridade a uma sequência consenso *splicing* e originam novos locais de *splicing*. O fenótipo depende da frequência com que o novo local é usado. A alteração IVS-I-110 (G→A), a mutação mais comum na Bacia Mediterrânica e com uma incidência de 12,3% na região centro de Portugal, origina um local de *splice acceptor* alternativo, que é usado para o *splicing* de cerca de 90% do mRNA β -globínico [70]. A mutação IVS-I-116 (T→G) também origina um novo local de *splice acceptor*, que é usado em detrimento do local normal, o que resulta em β^0 -tal. Foram descritas quatro mutações no IVS-I-2 originando locais de *splicing* alternativos. A IVS-II-4,5 (-AG) foi descrita pela primeira vez numa família Portuguesa com β -tal *minor* [58].

3.1.3. Mutações que afectam a tradução

Algumas mutações alteram um codão que deveria codificar um aminoácido e passa a codificar um codão de terminação. A alteração CD39 CAG→TAG ocorre com elevada frequência na área mediterrânica, com uma prevalência de 32,3% na região centro de Portugal [70], e a alteração CD15 TGG→TGA, identificada em famílias Portuguesas, tem uma prevalência de 15,3% na mesma região [71]. A alteração CD17 AAG→TAG é comum no Sudoeste Asiático [72]. Também pequenas inserções ou deleções de nucleótidos nas regiões codificantes podem alterar a grelha de leitura, criando um codão *Stop* prematuro, e dando origem a uma cadeia globínica mais curta. Os pequenos péptidos não foram identificados, provavelmente devido à sua rápida proteólise nos percursores dos glóbulos vermelhos. Estas mutações *nonsense* e *frameshift* dão sempre origem a β^0 -tal.

Foram descritas cinco mutações no codão de iniciação (ATG) todas associadas com β^0 -tal. A ausência da metionina inicial leva à alteração na tradução do mRNA β -globínico e à completa ausência de produção de cadeias β . Como resultado desta alteração na grelha de leitura, o início da tradução ocorrerá provavelmente na primeira sequência ATG a jusante, que se localiza nos codões 21-22, e terminará provavelmente no novo codão terminação TGA nos codões 60-61 [73].

A substituição G→A na posição +22 relativamente ao *Cap site* origina um novo codão de iniciação, a montante do normal [74]. Bento *et al* (2000) [75] identificaram na população Portuguesa a mutação silenciosa 5' UTR +33 (C→G) em associação com mutação β -IVS-I-1 (G→A) resultando num fenótipo de β -tal intermédia.

Foi recentemente descrita [76] uma nova mutação β -globínica, $\beta+45$ G→C, com as características de uma mutação β -tal silenciosa. Nos heterozigóticos não há alteração dos parâmetros hematológicos, mas a sua interacção com a mutação β^0 -IVS-II-654 C→T acentuou o fenótipo em dois heterozigóticos compostos. A mutação $\beta+45$ G→C é a primeira mutação encontrada na sequência *Kozak* (GACACCATGG) do gene β -globínico e a primeira na posição -6 a montante do codão de iniciação ATG. A sequência consenso *Kozak* desempenha um papel importante na iniciação do processo de tradução. O estudo realizado apoia a importância do papel do G na posição -6 da sequência *Kozak* para optimização da tradução.

3.1.4. Clivagem do RNA e mutações no local de *poly A*

A clivagem do RNA e a poliadenilação são controladas por várias sequências específicas, próximas do local de clivagem 3', nomeadamente, a sequência AAUAAA cerca de 20 nucleótidos a montante do local de clivagem. Foram identificadas quatro mutações pontuais e duas pequenas deleções no sinal de poliadenilação do gene β -globínico, todas associadas a β^+ -tal [52]. Foi demonstrado que mutações no local AATAAA alteram a clivagem e a adição do *poly A* no terminal 3' do mRNA, levando à síntese de um transcrito alongado instável. O local de poliadenilação normal não é completamente eliminado, no entanto, estudos de expressão transitória mostram que apenas 10-20% dos transcritos de mRNA são clivados adequadamente [77].

Outras sequências presentes no 3'UTR influenciam a estabilidade do mRNA, servindo de local de ligação de uma proteína que o pode proteger da degradação [78]. A mutação +1480 C→G no nucleótido 6 da região 3' UTR em heterozigotia foi associada a β -tal silenciosa e estudos indicaram que o mRNA mutante é reduzido em 20-34% do normal. [79].

3.1.5. β -talassemias intermédias de transmissão dominante e cadeias β -globínicas instáveis

A nível molecular, as β -talassemias intermédias de transmissão dominante são heterogéneas, mas a maioria envolve mutações no 3º exão do gene β -globínico, e inclui *frameshifts*, terminação prematura de cadeias e rearranjos complexos, que levam à síntese de cadeias β -globínicas truncadas ou alongadas e altamente instáveis. Estas cadeias não são capazes de formar tetrâmeros com as cadeias α , acumulam-se e precipitam. A cadeia β anormal pode ter a capacidade de ligar um grupo heme que é libertado durante a proteólise e excretado como pirrol, produzindo uma urina negra, que é habitualmente referida nesses pacientes [80]. As cadeias anormais nunca foram detectadas, provavelmente devido à sua instabilidade. Estudos de quantificação de mRNA [81] mostraram que esses pacientes produzem níveis idênticos de β -mRNA normal e mutante. Todos esses alelos foram descritos em famílias isoladas excepto para a mutação GAA→TAA no codão 121, no entanto, é interessante notar que a severidade do fenótipo dos pacientes com esta mutação

nonsense é heterogéneo [82-83]. Estão descritos vários pacientes com uma mutação semelhante no CD 106 com um fenótipo de β -tal intermédia [84] e dois pacientes com a mutação *nonsense* T→A no CD 112 com um fenótipo consideravelmente suave [85]. Foi descrita numa família Portuguesa uma mutação que origina β -talassemia dominante e que é causada por uma deleção de (G)TGGCTGGTGT(G) e uma inserção de (G)GCAG(G) nos codões 134, 135, 136 e 137 do gene β -globínico; a cadeia resultante possui menos dois aminoácidos e é rapidamente degradada por proteólise [86].

3.1.6. β^0 -Talassemia deleccional

Foram descritas 13 deleções que removem parte ou a totalidade do gene β -globínico. São todas raras, excepto a deleção de 619 pb que representa 30% dos alelos β -tal na população Sind da Índia e Paquistão [87].

Os heterozigóticos para as grandes deleções têm Hb A₂ elevada (5,5-9%) e a maioria tem Hb F elevada (2,5-14%) [88]. Foi sugerido que a perda do promotor do gene β -globínico permitiria aos promotores δ e γ *in cis* aumentarem as suas interacções com os elementos regulatórios no LCR [89]. Esta hipótese é apoiada pelo estudo de um indivíduo com a deleção β -tal 1,39 Kb num alelo e uma variante das cadeias δ *in trans*, com um nível elevado de Hb A₂ derivado do gene δ *in cis* com a deleção β -tal [58]. A excepção é a deleção Sudoeste-Asiática de 27 Kb que remove o promotor β -globínico e o local 3' HS, e está associado com o ligeiro aumento da Hb A₂ e a níveis marcadamente elevados de Hb F (17,6-26,6%), comparáveis aos observados na HPFH (persistência hereditária da hemoglobina fetal) [90].

3.1.7. Mosaicismo devido a deleção somática no gene β -globínico

Este novo mecanismo foi descrito recentemente [91] num indivíduo que apresentava talassemia intermédia moderadamente severa, apesar de ser apenas heterozigótico para um alelo β^0 -tal com genótipo α normal. Estudos subsequentes revelaram que possuía uma deleção somática de uma região do cromossoma 11p15 incluindo o complexo β -globínico, dando origem a células em mosaico (50% com um gene

e 50% sem qualquer gene β). A soma total do produto β -globínico foi calculada em aproximadamente 25% menos do que na β^0 -tal heterozigótica.

3.2. Bases moleculares da δ -talassemia

O gene δ -globínico normal tem uma produção muito baixa e as δ -talassemias são condições benignas sem relevância clínica. Estão descritas dezassete mutações e uma deleção de 7,2 Kb que se estende de 3' $\psi\beta$ até à IVS-II do gene δ (deleção Corfu) [52]. As bases dos mecanismos moleculares que levam à redução ou ausência da síntese das cadeias δ -globínicas são as mesmas descritas para o gene β -globínico. As cadeias δ são mais carregadas positivamente que as β ou γ , e em condições normais, os dímeros $\alpha\beta$ são formados preferencialmente em relação aos dímeros $\alpha\delta$. Na presença de uma α -tal, o efeito da carga é incrementado e o nível de Hb A₂ é menor [80]. A interação entre α - e β -tal pode resultar numa β -tal com níveis de Hb A₂ normais. A co-herança de um alelo δ - e β -tal *in cis* ou *in trans*, resulta num fenótipo de β -tal *minor*, com valores de Hb A₂ normais ou diminuídos, sendo o diagnóstico usualmente confundido com α^+ -tal. A mutação δ^{59} (-A) foi identificada *in cis* com as mutações β° CD39 (C→T) e IVS-I-110 (G→A) [92], e a mutação δ^+ CD27 (C→T) *in cis* com a alteração β -IVS-II-745 (C→G) [93]. A deleção Corfu foi encontrada *in cis* e *in trans* com cada uma das mutações β^+ -IVSI-5 e β^0 -39 [94-98].

3.3. Bases moleculares da α -talassemia

Ao contrário da β -tal, a α -tal está mais frequentemente associada a grandes deleções que englobam um ou os dois genes α . A α -tal pode ser causada por um conjunto heterogéneo de deleções que envolvem os dois genes α -globínicos ou o elemento regulatório α -globínico, HS-40 (α^0 -tal) ou pode resultar de deleções de apenas um dos genes α -globínicos ou de mutações pontuais (α^+ -tal). Quase todas estas deleções são o resultado de eventos de recombinação não homólogos.

3.3.1. α -Talassemia deleccional

3.3.1.1. Delecções que removem parte ou a totalidade do *cluster* de genes α -globínicos (α^0 -tal)

Estas delecções removem, completa ou parcialmente, ambos os genes α -globínicos ($--/\alpha\alpha$), do que resulta um fenótipo α^0 -tal. Os homozigóticos para esta condição apresentam Hb Bart's (γ_4) *hydropsis fetalis*, originando morte fetal. As delecções mais comuns são a ($--^{SEA}$) no Sudoeste Asiático e a ($--^{MED}$) e $-(\alpha)^{20.5}$ na área mediterrânica. A delecção ($--^{SEA}$) abrange aproximadamente uma região de 20 Kb e remove os genes globínicos $\psi\alpha_2-$, $\psi\alpha_1-$, α_2- , α_1- , e θ_1 (figura I.4). O *breakpoint* 5' para a delecção ($--^{MED}$) está localizado a 5' do $\psi\zeta_1$, e o *breakpoint* 3' imediatamente a 5' do θ_1 [99]. A delecção $-(\alpha)^{20.5}$ remove uma região de 20.5 Kb, que se estende da zona 5' do $\psi\zeta_1$ até ao CD 51 do gene globínico α_1 [100]. Foram detectadas cinco delecções em famílias espanholas isoladas: $--^{CI}$ é uma delecção de 27 Kb com o *breakpoint* 5' entre ζ - $\psi\zeta$, e o 3' a jusante da região 3' HVR [101]; as delecções $--^{CANT}$ e $--^{SPAN}$, de 14 e 11 Kb respectivamente, removem ambos os genes α [102-103]; a $--^{MA}$ é uma delecção de 22 Kb que se estende desde o 3' de ζ até ao 3' do gene α_1 e foi detectado num cromossoma portador da triplicação do gene ζ [104]; a quinta, $--^{BRIT}$, é uma grande delecção de pelo menos 100 Kb, abrangendo a totalidade do *cluster* de genes globínicos do tipo α [103]. Uma outra delecção, de ≈ 32 Kb, chamada $--^{CAL}$, foi primeiro detectada numa família de Calábria [105], e posteriormente numa família espanhola [106], e remove todo o *cluster* α -globínico.

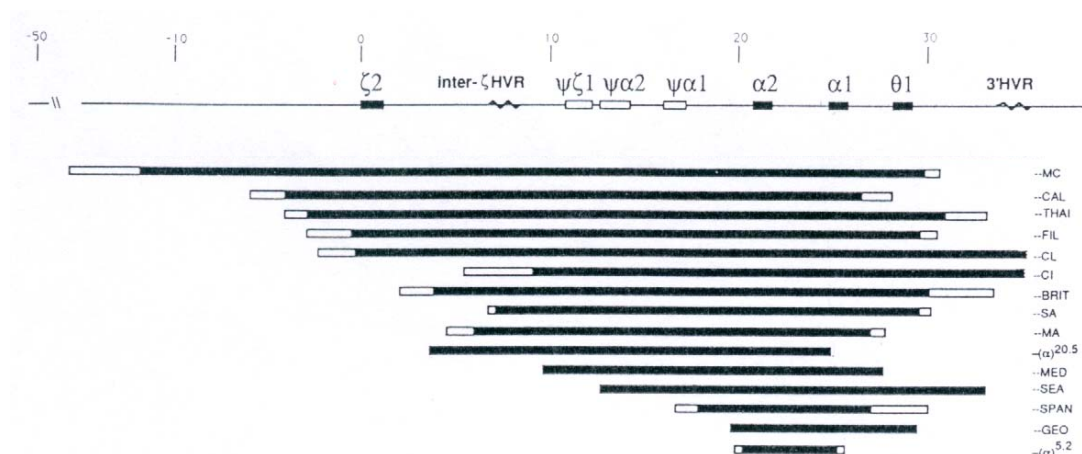


Figura I.4. Deleções que causam α^0 -talassemia. No *cluster* α -globínico os genes estão representados em caixas a negro e os pseudogenes em caixas brancas. A extensão das deleções é mostrada em barras sólidas, com as regiões de *breakpoints* mal definidos em caixas abertas. (Adaptado de Higgs *et al* (1993) [37]).

Várias mutações removem ambos os genes α e ζ [107-108]. Os heterozigóticos têm um fenótipo clássico de α^0 -tal, mas é improvável que os homozigóticos possam sobreviver, mesmo em fases iniciais do desenvolvimento, uma vez que não podem sintetizar as Hbs embrionárias e fetais. Algumas das deleções, nas quais o gene embrionário permanece intacto, tem pequenas quantidades de ζ -globina na vida fetal e adulta [109].

Deleções que removem o LCR do *cluster* α -globínico deixam os genes α intactos, mas inactivam completamente a sua expressão [110-116] (figura I.5). A $(\alpha\alpha)^{MM}$ é uma deleção de pelo menos 105,5 Kb, detectada num indivíduo dos Açores, Portugal, que tem início a 5' do gene ζ e se estende para o telómero do 16p [113].

Recentemente, foi identificada uma deleção de 48 Kb, *de novo*, na região flanqueadora telomérica do *cluster* dos genes α , que resulta de uma recombinação não homóloga entre dois elementos repetidos que distam normalmente ≈ 83 -131 Kb do telómero 16p. A deleção remove os elementos regulatórios HS-40 e HS-33, mas deixa intactos os HS-10 e HS-8, demonstrando que estes dois últimos locais, por si só, não são capazes de activar a expressão normal dos genes α . Esta deleção, assim como outras descritas para a região telomérica, subregula severamente a expressão α -globínica [45]. O

HS-40 é um activador importante da síntese das cadeias α -globínicas; ainda não foi esclarecida a função do HS-33, por si só ou em combinação com o HS-40 [117].

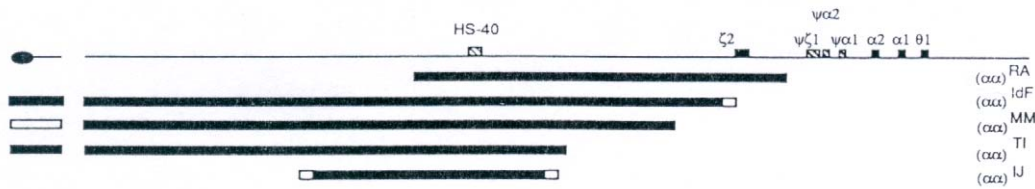


Figura I.5. Deleções a montante do *cluster* de genes α -globínicos que originam α^0 -talassemia. Está evidenciado o elemento regulatório HS-40, os genes e pseudogenes. A extensão das deleções é mostrada em barras sólidas, com as regiões de *breakpoints* mal definidos em caixas abertas. (Adaptado de Higgs *et al* (1993) [37]).

Algumas grandes deleções (1-2 megabases) da extremidade do braço curto do cromossoma #16, que removem múltiplos genes, incluindo o *cluster* das cadeias α -globínicas, originam anomalias no desenvolvimento em associação com α^0 -tal. Estas condições são referidas como síndrome ATR-16 - α -talassemia/ atraso mental [118-120].

3.3.1.2. Deleções que removem um dos dois genes α -globínicos (α^+ -tal)

As deleções mais comuns associadas com o fenótipo α^+ -tal são as deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$. Cada gene α tem uma região de homologia dividida em três sub-segmentos (X, Y e Z) por elementos não homólogos (I, II e III). Eventos de recombinação não homólogos entre os segmentos Z dão origem a um alelo com apenas um gene α , que é um gene híbrido $\alpha_2\alpha_1$ ($-\alpha^{3.7}$, deleção à direita) (figura I.6) e outro com três genes α ($\alpha\alpha\alpha^{3.7}$). Os produtos $-\alpha^{3.7}$ podem ser divididos no tipo I, II e III, pela localização exacta da recombinação na caixa Z. Recombinação não homólogos entre caixas X também dá origem a um alelo com um gene α ($-\alpha^{4.2}$, deleção à esquerda) e outro com três genes α ($\alpha\alpha\alpha^{4.2}$) [121]. Eventos posteriores de recombinação entre os cromossomas resultantes dão origem a genes α quadruplicados ($\alpha\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$, $\alpha\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 4.2}$) [122-123] ou a outros rearranjos mais raros. Foram descritas algumas deleções que envolvem um dos genes α produzindo um fenótipo α^+ -tal. A deleção $-\alpha^{3.5}$ remove completamente o gene α_1 e as suas regiões flangeadoras

[124]; a deleção $(\alpha)\alpha^{5.3}$ tem o *breakpoint* 5' localizado 822 pb a montante do *Cap site* do gene $\psi\alpha_1$ e o *breakpoint* 3' no IVS-I do gene α_2 [125]; uma deleção rara, removendo o gene α_1 ($-\alpha^{2.7}$), foi descrita num doente chinês com doença da Hb H [126] (figura I.7). A deleção $-\alpha^{7.9}$ descrita recentemente [127] é a segunda deleção α^+ -talassémica na qual o *breakpoint* 5' se localiza na região intergénica entre os genes $\psi\alpha_2$ - e $\psi\alpha_1$ -globínicos. Esta deleção sugere um evento de recombinação não homólogo e foi detectada em duas famílias Indianas não relacionadas.

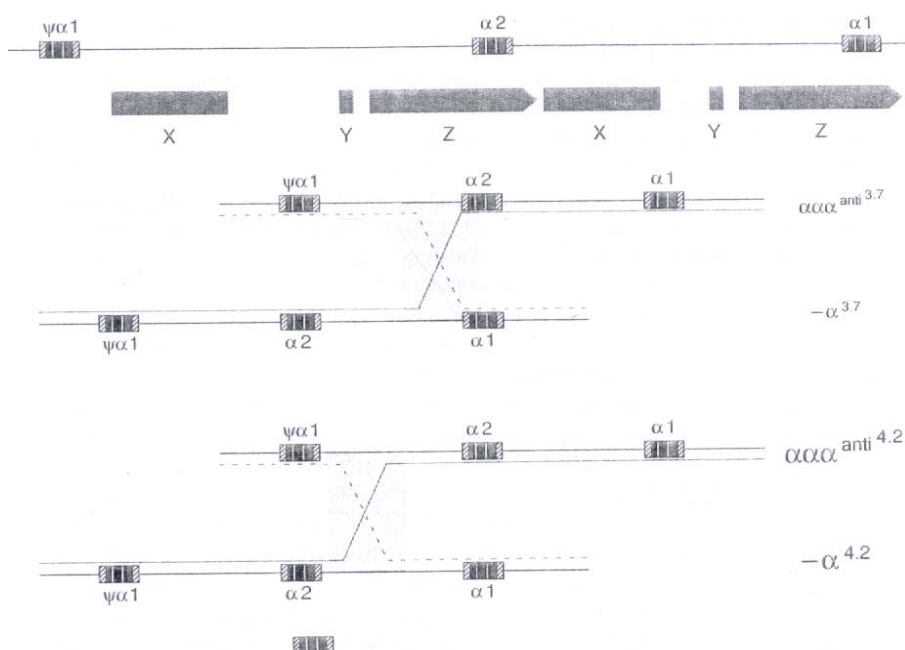


Figura I.6. *Crossingovers* que dão origem às duas formas mais comuns de α^+ -talassemia. As caixas X, Y e Z são regiões de homologia. As duas caixas Z estão afastadas 3,7 kb e *crossingovers* não homólogos originam um alelo com um único gene α híbrido e um com três genes α . Da mesma forma, as caixas X, que estão afastadas 4,2 kb podem também sofrer *crossingovers* não homólogos, que dá origem a uma deleção de 4,2 kb. (Adaptado de Higgs *et al* (1993) [37]).

A quantificação do gene híbrido $\alpha_2\alpha_1$, resultante da deleção de 3,7 Kb, indica que este gene transcreve menos 30% de mRNA do que um gene α_2 -globínico normal, o que pode resultar da perda de algumas sequências a 3' do gene α_2 [33]. O mesmo pode acontecer com o gene α_1 restante da deleção α^+ -tal de 4,2 Kb. Estas experiências também

sugerem que o gene híbrido $\alpha_1\alpha_2$ da triplicação $\alpha_2(\alpha_1\alpha_2)\alpha_1$ expressa-se como um gene α_2 [33].

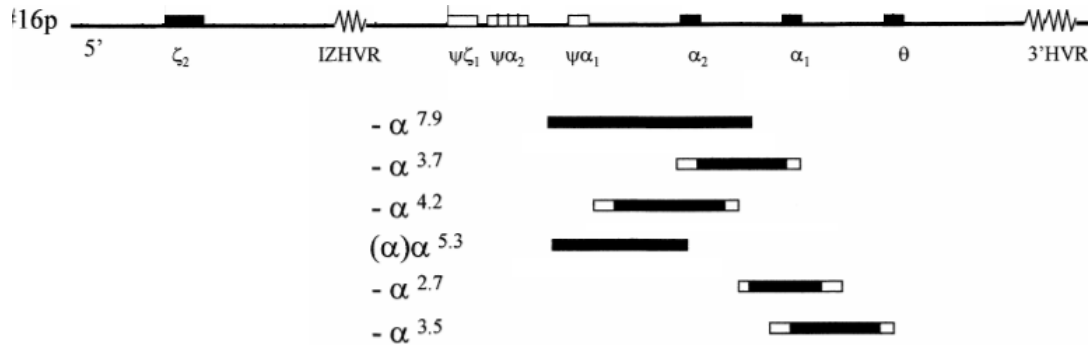


Figura I.7. Representação esquemática do *cluster* de genes α -globínicos. Os genes estão indicados como caixas negras e os pseudogenes como caixas brancas. As deleções que afectam um dos genes α estão indicadas nas barras negras. As porções brancas das barras indicam que os *breakpoints* exactos não são conhecidos. (Adaptado de Hartevelde *et al* (2003) [127]).

Um segmento de DNA deleccionado de mais de 18 Kb situado entre os genes α_2 e α_1 e que remove o gene α_1 ($\alpha\alpha/\alpha^{-ZF}$) provoca um fenótipo muito mais severo do que o habitualmente acontece em indivíduos com três genes α funcionais, sugerindo que o gene do cromossoma afectado possa estar sub-regulado como consequência desta mutação [128]. Embora o HS-40 e o gene α_2 do cromossoma α^{-ZF} permaneçam intactos, a expressão α -globínica daquele cromossoma é eliminada. Alterações no padrão de metilação e hipersensibilidade da DNAase no *cluster* sugerem que esta deleção em vez de remover elementos regulatórios positivos, silencia o gene α_2 através de um efeito posicional negativo no cromossoma. O gene é silenciado pela sua justaposição à região a jusante rica em repetições metiladas *Alu*.

3.3.2. α -Talassemia não deleccional

O número de mutações pontuais que ocorrem nos genes globínicos α_2 e α_1 é provavelmente muito próximo [35], mas, as mutações pontuais associadas a α -tal têm sido maioritariamente descritas no gene α_2 . Baseado na quantificação do mRNA [34] em correlação com os fenótipos [129-130], foi aceite que as α -tal não deleccionais que

afectam o gene α_2 ($\alpha^T\alpha$), tendem a ser mais severas do que as do gene α_1 ($\alpha\alpha^T$). No entanto, estudos de mRNA mais recentes, e o facto da interacção da Hb Quong Sze (α_2 CD 125 Leu-Pro) com um alelo α^0 -tal, e da Hb Adana (α_1 CD59 Gly-Asp) com uma deleção α^0 -tal [131-132] resultar em doença da Hb H de igual severidade, sugere uma expressão similar de ambos os genes *in vivo* [35]. Parece também que os alelos α^+ -tal ($\alpha^T\alpha$) não deleccionais têm um fenótipo mais severo do que a α^+ -tal resultante de deleções [37], no entanto, a mutação IVS-I 117 (G→A) no gene globínico α_1 em associação com os alelos $-\alpha^{3.7}$ ou $-\alpha^{4.2}$ ($-\alpha/\alpha^T$) resulta numa deficiência das cadeias α similar à de um homozigótico α^+ -tal ($-\alpha/-\alpha$) [133]).

Os mecanismos da α -tal não deleccional são basicamente os mesmos que os da β -tal. Foram descritas seis mutações pontuais que afectam o processamento do mRNA: 3 no local *poly A* do gene α_2 [134-137]; uma deleção de 5 nt no local 5' *donor* do IVS-I do gene α_2 ($\alpha^{\text{Hph}}\alpha$) [138], uma no local *acceptor splice* do IVS-I do gene α_1 [IVS-I-117 (G→A)] [133] e outra no local consenso *donor splice* α_1 IVS-I-1 (G→A), em combinação com α^0 -tal ($--^{\text{SEA}}$), numa família tailandesa com doença da HbH [139]. Doentes homozigóticos para a mutação no sinal *poly A* (AATAAA→AATAAG) [135] têm doença da Hb H; heterozigóticos compostos para a mutação AATGAA→AATAAA [136] e um alelo α^0 -tal têm um fenótipo mais severo do que é habitualmente observado em indivíduos com os 3 genes α deleccionados; heterozigóticos para uma deleção de 2 nts (α_2 , AATGAA→AATA--) apresentam um fenótipo de α^+ -tal [137]. Estas observações sugerem que alterações na transcrição devido a mutações na sequência de poliadenilação do gene α_2 podem interferir com a expressão do gene α_1 .

Várias mutações afectam a tradução do mRNA: três delas destroem o codão de iniciação, duas no gene α_2 [140-141] e uma no gene α_1 [142]. Um doente homozigótico para uma mutação no codão de iniciação (ATG → ACG ($\alpha^{\text{NcoI}}\alpha$)) tem uma doença da Hb H [140]. Foi recentemente encontrada uma deleção de 2 nucleótidos na proximidade do codão de iniciação de um alelo $-\alpha^{3.7}$ originando uma forma severa de α^+ -tal, em que a tradução está diminuída entre 30-50% [143]. Estão descritas duas mutações que dão origem a um codão de terminação prematuro, uma mutação *nonsense*, $\alpha 116$ (GAG→TAG) [144] e outra mutação *frameshift* resultante de uma deleção AG nos CDs 30/31 de um alelo $-\alpha^{3.7}$ [145]. Foram descritas cinco mutações no CD terminação do gene α_2 [146-150].

Estas mutações dão origem a cadeias α alongadas, com 172 aminoácidos, capazes de formar tetrâmeros de Hb, como a Hb Constant Spring (α_2 CD 142 TAA-CAA, extensão de 31 aminoácidos).

Algumas mutações resultam em variantes α -globínicas altamente instáveis [151-152], como a Hb Quong Sze (α_2 CD125 Leu-Pro), que são rapidamente destruídas por proteólise. Os níveis de mRNA são normais. A maioria destas mutações está localizada no terceiro exão. Foi recentemente descrita uma variante talassémica altamente instável, Hb PaK Num Po (α_1 CD131, +T), resultante da inserção de uma timidina no gene α_1 , que dá origem um polipeptídeo com 34 aminoácidos adicionais [153].

3.3.3. Síndrome ATR-X

Existe um grupo de doentes com uma forma suave da doença da Hb H e atraso mental, em que não foram detectadas alterações no *cluster* dos genes α . Este síndrome tem transmissão associada ao cromossoma X, foi chamado de Síndrome ATR-X, e é uma forma severa de atraso mental frequentemente associado a anomalias urogenitais, dismorfismo facial e uma síntese diminuída de cadeias α -globínicas (α -talassemia) [154-155]. O síndrome é causado por mutações num gene ligado ao cromossoma X (hATRX) que codifica uma proteína com um homeodomínio do tipo motivo *Zinc finger* e um da família SF2 das ATPases [156]. Estes motivos sugerem que o gene hATRX pode funcionar como um regulador da expressão de vários genes, incluindo os α -globínicos, provavelmente como parte do complexo de remodelação cromatínica, no entanto, a função celular exacta ainda não está completamente elucidada [157].

3.4. Bases moleculares das variantes de Hemoglobinas

A maioria das variantes de Hb resulta de mutações pontuais, pequenas deleções ou inserções nas regiões codificantes dos genes globínicos, levando à substituição de aminoácidos, ou ao encurtamento ou alongamento das cadeias globínicas. Há um pequeno

grupo de variantes de hemoglobina formadas por cadeias “híbridas” que resultam de *crossingovers* não homólogos dos genes δ e β , ou γ e β [52].

3.4.1. Hemoglobinas com uma ou duas substituições de aminoácidos

Mais de 70% das cerca de 830 variantes de Hb descritas são causadas por mutações pontuais nas regiões codificantes dos genes de uma das cadeias globínicas. A maioria das variantes de Hb identificadas são variantes β (56%), provavelmente porque mutações num dos 2 genes β -globínicos causam mais frequentemente alterações fenotípicas do que mutações num dos 4 genes α -globínicos. Cada mutação pontual leva à síntese de cadeias globínicas diferentes e consequentemente à formação de variantes de Hb com características diferentes; algumas destas variantes de Hb podem ser detectadas por métodos electroforéticos e/ou cromatográficos [23].

A substituição de aminoácidos em determinadas posições das cadeias globínicas causam instabilidade da molécula de Hb, que desnatura e precipita. A Hb desnaturada liga-se à membrana do glóbulo vermelho formando os chamados *corpos de Heinz*. A instabilidade da variante de Hb pode ser o resultado de diferentes mecanismos. A substituição da histidina distal ($\beta 63$) ou proximal ($\alpha 87$; $\beta 92$) afecta a ligação do grupo heme ou permite o acesso de água e agentes oxidativos ao grupo heme. A substituição de grupos não carregados por resíduos aminoacídicos, em regiões que participam em interacções hidrofóbicas altera a estrutura terciária, permitindo à água penetrar no interior hidrofóbico. A introdução de um resíduo de prolina, que, pela sua conformação, só pode participar nas três primeiras posições na helix α , altera a estrutura secundária da Hb [23]. Delecções ou inserções de aminoácidos, especialmente nas regiões críticas das hélices, e alterações nos contactos das subunidades, podem criar instabilidade e levar à dissociação em monómeros.

A mutação GAG→GTC no CD 6 do gene β -globínico, que resulta numa substituição ácido glutâmico por valina na posição 6 da cadeia β -globínica dá origem à Hb S, a variante de Hb mais comum em todo o mundo. A substituição do aminoácido ocorre na superfície da molécula de Hb, onde causa apenas uma perturbação ligeira do tetrâmero, no entanto, altera drasticamente as características de solubilidade da Hb S desoxigenada, o que é crítico em situações de baixa tensão de oxigénio. A Hb S-desoxi

forma polímeros que se ligam à membrana celular dos glóbulos vermelhos e a distorcem [158] tornando-a rígida. Estes glóbulos vermelhos rígidos e deformados são as chamadas células falciformes, que provocam fenómenos de vaso-oclusão dos pequenos capilares. A polimerização depende da concentração da Hb S; nos heterozigóticos o nível de Hb S é normalmente insuficiente para originar a formação de polímeros. A Hb F não copolimeriza com a Hb S, e a formação de um híbrido assimétrico solúvel $\alpha_2\gamma\beta^S$ inibe a formação de polímeros Hb S.

Um grupo de variantes de Hb tem afinidade aumentada para o oxigénio e podem causar um quadro clínico de eritrocitose. Exemplos destas variantes são a Hb Vila Real (β CD36 Pro \rightarrow His), e a Hb Coimbra (β CD99 Asp \rightarrow Glu) descritas em famílias Portuguesas [159-160]. Este aumento da afinidade para o oxigénio resulta de alterações estruturais que modificam o equilíbrio entre a estrutura desoxigenada e a oxigenada. A maioria dos doentes com eritrocitose tem mutações nos locais de ligação para o 2,3-DPG, no terminal carboxílico da cadeia β ou nos locais de contacto $\alpha_1\beta_2$ [23].

Estão descritas mais de 25 variantes de Hb com diminuição da afinidade pelo oxigénio. As hemoglobinas M são um destes exemplos, sendo que estas hemoglobinas são incapazes de transportar o oxigénio eficientemente. Nestas variantes as substituições de aminoácidos envolvem resíduos que participam no contacto com o heme, ou há introdução de um resíduo de prolina em posições críticas [161].

Foram identificadas 96 variantes de Hb de cadeias γ , no entanto, excepto em alguns casos em que há cianose ligeira à nascença, nenhuma das variantes γ descritas está associada a um fenótipo severo. Foram encontradas 57 variantes de Hb de cadeias δ , sem interesse clínico [53, 161].

Algumas variantes de Hb têm duas substituições de aminoácidos na mesma cadeia globínica, provavelmente resultante de um *crossingover* entre dois genes, cada um com uma mutação ou de uma nova mutação num gene que já tinha substituição de uma base. Há seis variantes em que a mutação β^S se associa a uma outra substituição [5].

3.4.2. Hemoglobinas com cadeias híbridas

As cadeias globínicas de fusão são sintetizadas por genes híbridos resultantes do *crossing-over* não homólogo entre cromossomas mal alinhados durante a meiose. Há 8 variantes descritas [53]. A Hb Lepore, com cadeias globínicas $\delta\beta$, é a variante de Hb mais frequente entre os Portugueses autóctones [162]. As Hbs Lepore são formadas por duas cadeias α e duas cadeias híbridas $\delta\beta$, que têm a sequência de aminoácidos da cadeia δ no terminal-N e da cadeia β no terminal-C [163]. Durante a meiose são formados dois alelos anormais: um “cromossoma Lepore” com uma deleção de ≈ 7 Kb e um gene híbrido $\delta\beta$, e um “cromossoma anti-Lepore”, com os genes normais δ e β e o gene de fusão $\beta\delta$ na região inter $\delta\beta$.

A Hb Kenya, o único híbrido $^A\gamma\text{-}\beta$ conhecido, resulta de uma deleção de $\approx 22,3$ Kb, que inclui a extremidade 3' da $^A\gamma$, o δ completo e a extremidade 5' do β [164]. Os heterozigóticos têm cerca de 6% de Hb Kenya, Hb F aumentada até 10% ($^G\gamma$ Hb F) e Hb A₂ normal. Este fenótipo pode ser explicado pela deleção dos promotores dos genes δ e β , que elimina a competição entre os promotores dos genes γ , δ e β pela ligação às sequências LCR, ou pelo facto da deleção abranger o *enhancer* na vizinhança dos genes γ . A substituição do $^A\gamma\text{-IVS-II}$ pelo $\beta\text{-IVS-II}$ pode influenciar o silenciamento do gene $^A\gamma$ -globínico.

3.4.3. Hemoglobinas com cadeias α ou β alongadas

Estão descritas seis variantes de Hb com cadeias β alongadas e sete com cadeias α alongadas no terminal C- ou N- [161]. A formação de cadeias globínicas alongadas resulta de mutações pontuais no codão de terminação, mutações *frameshifts*, preservação das metioninas de iniciação e inserção de três bases ou múltiplos de três, que comprometem a grelha de leitura do mRNA. Uma substituição nucleotídica no gene α_2 -globínico no codão de terminação TAA substitui o sinal *Stop* por um codão que codifica para um aminoácido. As cadeias sintetizadas são alongadas no seu terminal 3' em 31 aminoácidos. As cinco variantes α_2 com mutações no codão de terminação TAA estão associadas com o fenótipo α -tal, com anemia ligeira e microcitose nos heterozigóticos. Quatro destas variantes são

raras; a Hb Constant Spring ($\alpha_2\text{TAA}\rightarrow\text{CAA}$), que resulta de uma mutação pontual no codão de terminação do gene α_2 -globínico, é comum nas populações do Leste Asiático. A Hb Constant Spring tem níveis baixos nos heterozigóticos (1-2%) e nos homozigóticos, porque este tipo de cadeias alongadas é bastante instável. Os indivíduos homozigóticos ($\alpha^{\text{CS}}\alpha/\alpha^{\text{CS}}\alpha$) têm um quadro clínico idêntico aos que têm doença da Hb H [165]. A Hb Constant Spring em associação com α^0 -tal origina uma forma severa de doença da Hb H. Estão descritas outras quatro variantes com diferentes extensões do terminal-C, resultantes de *frameshifts* no terminal 3' do terceiro exão do gene α_2 -globínico.

3.4.4. Hemoglobinas com deleções e/ou inserções nos genes α ou β -globínicos

Foram descritas seis variantes de Hb de cadeias α e dezasseis de cadeias β resultantes de genes com deleções ou inserções de 1 a 5 nucleótidos, ou com uma deleção combinada com uma inserção [161]. Todas estas variantes são instáveis e frequentemente os portadores têm uma anemia hemolítica crónica severa [23]. A única descrição de uma deleção / inserção nos genes α -globínicos é a deleção de 9 pb (codões 39-41 do gene α_2) / inserção de 8 nucleótidos, duplicando a sequência a jusante [166].

4. AHSP (Proteína estabilizadora das cadeias α)

Embora a β -talassemia seja considerada uma doença monogénica clássica, verifica-se uma heterogeneidade clínica considerável entre doentes com a mesma mutação no gene das cadeias globínicas β , sugerindo a influência de outros determinantes genéticos. Foi mostrado recentemente que uma proteína eritróide altamente expressa, a AHSP (proteína estabilizadora das cadeias α), liga selectivamente e estabiliza as cadeias α livres, evitando a sua precipitação; variações na estrutura ou na síntese da proteína AHSP podem influenciar a severidade clínica da β -talassemia [167-168]. Ratinhos sem AHSP têm alterações na produção e semi-vida dos glóbulos vermelhos e o fenótipo de β -talassemia

intermédia mais agravado [169]. Com base nestas observações foi proposto que alelos que alterem a produção ou a função da AHSP possam contribuir para alguma da variabilidade clínica observada em indivíduos com β talassemia [167, 170]. Galanello *et al* (2003) [171] reportaram duas famílias não relacionadas na Sardenha nas quais a severidade da β -talassemia é concordante com a expressão reduzida de mRNA de AHSP, embora não tenham sido detectadas mutações na região codificante ou promotora do gene da AHSP. Apesar destas observações, permanece a dúvida se mutações no gene AHSP, ou eventos epigenéticos que alterem a sua expressão, são factores moduladores do fenótipo na β -talassemia e seria importante o estudo do gene AHSP, do mRNA do AHSP e da proteína AHSP em diferentes populações.

Dado que os efeitos nefastos das cadeias livres parecem ser atenuados pela AHSP, é possível que o desenvolvimento de fármacos ou péptidos que mimetizem a sua actividade possam proporcionar novas estratégias farmacológicas para o tratamento das formas graves de β -talassemia [172].

5. Mutações no gene *DMT1* (Transportador de metais divalente)

Recentemente tem vindo a colocar-se a hipótese de que alguns indivíduos com anemia hipocrómica e microcítica, excluída a presença de uma talassemia e sideropenia, tenham uma mutação no gene *DMT1*.

O transportador de metais divalente (DMT1), também conhecido como Nramp2 ou DCT1, é uma proteína transmembranar crucial na absorção duodenal de ferro e no transporte eritróide de ferro [173-174]. O gene *DMT1* codifica duas isoformas, produzidas por *splicing* alternativo dos terminais 5' e 3' do pré mRNA. A isoforma I, contém um elemento de resposta ao ferro (IRE) na região 3' enquanto que a isoforma II não possui o IRE e os 18 aminoácidos finais do C-terminal estão substituídos por uma nova sequência de 25 aminoácidos [175]. O duodeno expressa maioritariamente a isoforma I [176], onde se pensa que medeia a acumulação de ferro ferroso dependente do pH do lúmen intestinal [177]; os eritroblastos expressam a isoforma II [176, 178] que transporta o ferro libertado do receptor da transferrina para a mitocôndria, local de síntese do heme [178]; outros tecidos, como o rim, cérebro, fígado e timo expressam ambas as isoformas [176].

Estudos genéticos em ratinhos com deficiência em ferro e anemia microcítica mostraram que o *DMT1* apresenta a mutação Gly→Arg na posição 185. Os modelos tinham anemia hipocrômica e microcítica severa devido à diminuição da absorção de ferro no intestino e ao deficiente transporte e utilização de ferro nos tecidos periféricos, incluindo os precursores eritróides [179-180]. Estudos *in vivo* mostraram que a anemia não era corrigida com administração de ferro, provavelmente devido a um bloqueio na utilização de ferro pelos precursores eritróides, o que sugere que a proteína DMT1 está envolvida não apenas na absorção intestinal do ferro, mas também no seu metabolismo nos tecidos periféricos [181]. A fraca expressão da isoforma II da DMT1 nas células eritróides dos modelos e a perda de actividade transportadora associada à mutação DMT1 Gly185Arg, podem contribuir para a diminuição da acumulação de ferro nos eritrócitos, de que resulta uma anemia hipocrômica e microcítica severa. A mutação Gly185Arg pode afectar a estabilidade e/ou a função no local funcional da proteína DMT1 nas células eritróides [178].

Foi descrito recentemente um indivíduo com anemia hipocrômica e microcítica e com excesso de ferro. Após exclusão de talassemia, foi posta a hipótese de uma deficiência no transporte e utilização de ferro nas células eritróides, consequente a uma expressão diminuída de *DMT1* [182]. Foi posteriormente identificada nesse indivíduo a primeira mutação humana no gene *DMT1*, uma substituição Glu→Asp na posição 1285, no último codão do exão 12, que leva à exclusão deste exão durante o processamento do mRNA. A não tradução do exão 12 faz com que a proteína fique sem o domínio transmembranar 8, o que provavelmente interfere com a inserção correcta da proteína na membrana.

Ao contrário do que acontece nos ratinhos, o indivíduo apresenta um excesso de ferro que poderá ser devido a uma absorção elevada em resposta à anemia. Parece haver uma discrepância entre a absorção de ferro no duodeno e a sua utilização nas células eritróides [183], o que pode estar relacionado com o mecanismo de absorção do ferro hémico, um processo ainda não completamente caracterizado. O ferro hémico é fracamente absorvido por ratinhos, mas em humanos com dieta rica em carne, estima-se que 2/3 do ferro absorvido seja derivado do heme [184]. Deste modo, em humanos a alteração na proteína DMT1 afectará principalmente a utilização de ferro e não a sua absorção, resultando num fenótipo diferente do observado nos ratinhos [183].

6. Características clínicas e hematológicas

As hemoglobinopatias, alterações qualitativas ou quantitativas da Hb, resultam de mutações num ou mais genes das cadeias globínicas. Estas alterações moleculares podem levar a: redução ou eliminação da síntese da cadeia globínica normal, dando origem às talassemias ou a uma taxa de síntese normal ou reduzida de uma cadeia globínica estruturalmente anormal, dando origem às variantes de Hb.

Nas talassemias há um desequilíbrio na síntese das cadeias globínicas α /não α , e a sua fisiopatologia resulta da produção reduzida ou ausente de uma das cadeias e do excesso relativo da outra cadeia. No caso da β -tal este desequilíbrio vai sobrecarregar os mecanismos proteolíticos do glóbulo vermelho; o que não acontece na α -tal porque as cadeias β -globínicas em excesso formam homotetrâmeros estáveis. A severidade clínica das talassemias é proporcional ao grau de desequilíbrio das cadeias disponíveis para formar os tetrâmeros da Hb [22]. Nas variantes de Hb as manifestações clínicas dependem do tipo de cadeia anormal que é sintetizada e de como vai alterar a estrutura da Hb.

6.1. α -Talassemia

6.1.1. α^+ -Tal

Os indivíduos com três genes α -globínicos normais (heterozigóticos α^+ -tal) têm níveis normais de Hb, volume globular médio (VGM) e hemoglobina globular média (HGM) nos limites inferiores da normalidade e morfologia dos glóbulos vermelhos normal. Nos primeiros anos de vida a hipocromia e a microcitose são mais acentuadas. Durante o período neonatal podem apresentar 1 a 2% de Hb Bart's (γ_4) [37]. Estudos de síntese de cadeias globínicas mostram uma ligeira diminuição na síntese das cadeias α -globínicas, mas os valores sobrepõem-se com os normais [9]. O diagnóstico é geralmente inferido através de estudos familiares, com um ou os dois progenitores com parâmetros hematológicos semelhantes. Os homozigóticos α^+ ($-\alpha/-\alpha$) e heterozigóticos compostos ($-\alpha/\alpha^T\alpha$ e alguns $\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$) assemelham-se aos heterozigóticos α^0 -tal.

6.1.2. α^0 -Tal

A α^0 -tal resulta de mutações ou deleções dos dois genes α -globínicos *in cis* [185]. Os portadores têm uma anemia ligeira, com microcitose e hipocromia significativas (HGM 20-25 pg e VGM 70-80 fL em portadores adultos) e uma diminuição do rácio de síntese de cadeias α/β *in vitro* para 0,5-0,7 (normal 0,9-1,1) [186]. Podem ser encontradas alguns glóbulos vermelhos com corpos de inclusão de Hb H (homotetrâmeros de cadeias β -globínicas), que se detectam após incubação com azul de *crasil* brilhante [187]. A α^0 -tal distingue-se da β *minor* por ter valores normais de Hb A₂. Durante o período neo-natal as crianças com α^0 -tal têm até 5% de Hb Bart's, que desaparece por volta dos seis meses de vida [121]. Após este período é difícil distinguir este fenótipo clínico da deficiência em ferro ou de outras condições que são caracterizadas por hipocromia e microcitose. Os estudos familiares podem ajudar na estratégia do diagnóstico, nestes casos um dos progenitores deve ter hipocromia e microcitose.

6.1.3. Doença da Hb H

A doença da Hb H, a forma mais severa de α -tal compatível com a vida, resulta da deleção ou de mutações em três genes α -globínicos (α^0 -tal/ α^+ -tal; --/ α) [185]. É caracterizada por uma anemia hemolítica crónica de severidade variável: a maioria dos doentes tem uma anemia severa a moderada com níveis de Hb entre 2,6 a 13,3 g/dL [37], reticulocitose moderada, hipocromia e microcitose severas. A característica que faz facilmente o diagnóstico da doença da Hb H são os inúmeros corpos de inclusão, que resultam da precipitação da Hb H. O rácio de síntese de cadeias α/β é de 0,3-0,5 [187]. O nível de Hb Bart's (γ_4) no recém-nascido é de 15 a 30%, e durante o desenvolvimento é gradualmente substituído por Hb H (β_4), cujo nível no adulto varia entre 0,8 e 40%. Normalmente existe esplenomegalia e a esplenectomia pode diminuir a taxa de hemólise [37]. A anemia normalmente torna-se mais severa durante a gravidez, infecções e após ingestão de fármacos oxidantes que aumentam a oxidação e precipitação da Hb H [1].

6.1.4. Hb Bart's *hydropsis fetalis*

A Hb Bart's *hydropsis fetalis*, o estado homozigótico para α^0 -tal (--/--), é incompatível com a vida devido à incapacidade total de sintetizar cadeias α -globínicas. O feto geralmente morre precocemente *in utero* ou algumas horas após um nascimento prematuro, com edemas generalizados (*hydropsis*), ascites, hepatomegalia, baço moderadamente aumentado e anemia severa. A placenta é grande, podendo atingir um peso maior do que o feto. O esfregaço de sangue periférico apresenta eritroblastose severa (grande número de glóbulos vermelhos nucleados) anisopoiquilocitose, macrócitos grandes e hipocrómicos e policromasia. A hemoglobina predominante é a Hb Bart's (γ_4) (cerca de 80%), com níveis variáveis (10-20%) das Hbs embrionárias Portland-I ($\xi_2\gamma_2$) e Portland-II ($\xi_2\beta_2$), e uma pequena quantidade de Hb H. Estudos de síntese de cadeias mostram uma ausência total de produção de α -globina [3]. A causa da morte é a anemia e a hipóxia severas devidas às características da Hb Bart's, que tem uma elevada afinidade para o oxigénio, não possui efeito de Bohr, não tem interacção heme-heme e por isso é funcionalmente inútil para ao transporte de oxigénio [37].

6.2. β -Talassemia.

6.2.1. β -Tal *minor*

Os portadores de β -tal normalmente são assintomáticos, excepto em períodos de *stress*, como na gravidez, em que podem apresentar uma anemia mais acentuada. O diagnóstico é geralmente suspeitado por se encontrar hipocromia e microcitose (valores de VGM inferiores a 80 fL e de HGM inferiores a 27 pg no adulto) em hemograma de rotina. A Hb é geralmente um pouco abaixo dos valores normais para a idade e sexo. O esfregaço de sangue periférico mostra tipicamente um grau variável de microcitose e hipocromia. Na medula óssea há hiperplasia eritróide, com fraca hemoglobinação dos normoblastos. O diagnóstico é dado por um valor de HbA₂ acima do normal (geralmente >3,5%, mas depende da técnica utilizada) com electroforese de Hbs normal. Em cerca de metade dos

casos, os níveis de Hb F estão ligeiramente aumentados (1-5%). A síntese de cadeias globínicas *in vitro* apresenta um rácio α/β de cerca de 1,5-2,0 [30].

Algumas β -tal *minor* cursam com parâmetros hematológicos, Hb A₂ e Hb F normais, são as chamadas β -tal silenciosas, em que há apenas um ligeiro desequilíbrio da síntese de cadeias globínicas [80]. Os portadores de β -tal “silenciosa” são geralmente identificados em familiares de doentes com β -tal intermédia devida à interacção de um alelo β^0 -tal com um alelo β -tal silencioso.

O fenótipo clássico de β -tal *minor* pode ser modificado pela co-herança de um gene α -tal que normaliza os parâmetros hematológicos; ou de um gene δ -tal que ao diminuir a produção de cadeias δ evita o aumento da Hb A₂.

Indivíduos hipocrómicos e microcíticos com níveis de Hb A₂ normais ou ligeiramente reduzidos e níveis aumentados de Hb F (5-20%) podem ser portadores de $\delta\beta$ -tal [30].

6.2.2. β -Tal *major*

O quadro clínico e hematológico de β -tal *major* manifesta-se nos primeiros meses de vida, por palidez, dificuldades de desenvolvimento e esplenomegalia. A anemia é severa, hipocrómica e microcítica com anisopoiquilocitose extrema, macrócitos hipocrómicos, fragmentos celulares, pontuado basófilo e glóbulos vermelhos nucleados no sangue periférico. A medula óssea é hiper celular, com marcada hiperplasia eritróide e normoblastos mal hemoglobinizados. As cadeias α -globínicas não emparelhadas não são capazes de formar tetrâmeros viáveis, precipitam nos precursores eritróides formando corpos de inclusão responsáveis pela eritropoiese ineficaz [3]. O número de reticulócitos geralmente não é muito elevado devido à eritropoiese ineficaz; a Hb é quase exclusivamente Hb F, não há Hb A ou há uma muito pequena quantidade e a HbA₂ está presente em quantidades variáveis não tendo por isso valor para o diagnóstico.

Nestes doentes deve ser adoptado um programa regular de transfusões para manter níveis adequados de Hb e para diminuir a eritropoiese anormal e o excesso de produção de cadeias α -globínicas livres. Um regime transfusional apropriado e uma terapia de quelação de ferro permitem uma vida relativamente normal e uma sobrevivência até à terceira ou

quarta década de vida. Infelizmente esta terapia é muito dispendiosa e difícil de instituir em países de baixos recursos sócio-económicos. Sem quelação do ferro os doentes transfundidos ficam com hemossiderose maciça agravada por um aumento da taxa de absorção gastrointestinal devida à anemia. O excesso de ferro causa danos extensos no miocárdio, fígado, pâncreas e glândulas endócrinas. Se estes doentes atingirem a segunda ou terceira década de vida, a causa mais frequente de morte é uma falência cardíaca.

Sem transfusões regulares as complicações resultantes da anemia severa levam a uma morte prematura aos 3-4 anos de idade. Há um aumento progressivo do tamanho do fígado e do baço, com hiperesplenismo, trombocitopenia, leucopenia e rápida destruição dos glóbulos vermelhos transfundidos. Devido à grande expansão da medula óssea eritropoiética, na tentativa de compensar a anemia crónica, estes doentes têm alterações ósseas com um *facies* típico e frequentes fracturas dos ossos longos. As causas mais comuns de morte na primeira infância são a anemia não tratada e um aumento de susceptibilidade a infecções [188].

Actualmente, a melhor terapia é um transplante de medula óssea nos primeiros anos de vida, quando a hemossiderose ainda não é muito importante e não há nenhum grande dano orgânico [188].

6.2.3. β -Tal intermédia

O termo β -tal intermédia é uma designação clínica que engloba um vasto espectro de fenótipos não dependentes de transfusões regulares. Num extremo encontramos doentes que apresentam valores de Hb de cerca 6 g/dL, no outro extremo encontram-se indivíduos assintomáticos com valores de Hb de 8-12 g/dL, e que são diagnosticados por apresentarem esplenomegalia ou em estudos hematológicos de rotina. A base molecular da β -tal intermédia pode explicar este vasto espectro clínico: geralmente envolve a interacção entre diferentes alterações moleculares nos genes das cadeias globínicas e factores que corrigem parcialmente o desequilíbrio α/β . Estes doentes podem ter um excesso importante de ferro e as suas conseqüentes complicações [80, 188].

Os doentes com β -tal dominante têm o fenótipo clínico de uma β -tal intermédia, com anemia, icterícia, e esplenomegalia. A anemia é o resultado da eritropoiese ineficaz e de um componente hemolítico. A severidade é heterogénea, desde a anemia moderada até à

dependência de transfusões. Nos doentes com estas formas de talassemia podem ser detectados corpos de Heinz no sangue periférico, após esplenectomia [30].

Quando uma forma severa de β -tal é diagnosticada nos primeiros meses de vida pode ser difícil fazer a distinção entre uma forma *major* e uma intermédia. A caracterização molecular é importante para clarificar o diagnóstico e para estabelecer o prognóstico e tratamento correctos [188].

6.3. Variantes de Hemoglobina

Foram descritas mais de 830 variantes de Hb estruturalmente distintas [53, 161]; cerca de 70% são devidas a uma cadeia β -globínica anormal. A maioria das variantes não está associada a manifestações clínicas, foram descobertas acidentalmente ou durante estudos populacionais, mas têm sido importantes para o estudo da influência de algumas substituições de aminoácidos nas funções da Hb. A variante mais frequente em todo o mundo é a Hb S. Algumas variantes estão associadas a fenótipos talassémicos, como por exemplo a Hb Lepore, Hb E, Hb Knossos, Hb Constant Spring e Hb Quong Sze.

6.3.1. Drepanocitose

A Hb S ($\alpha_2\beta_2^6 \text{Val}$) apresenta uma elevada prevalência nas populações de origem Africana, o que está relacionado com uma maior resistência dos portadores às infecções graves por *Plasmodium*. Os portadores de Hb S (AS) são assintomáticos e têm parâmetros hematológicos normais [9]. Os homozigóticos ou heterozigóticos compostos com β -tal (S β -tal), Hb C (SC $\alpha_2\beta_2^6 \text{Val}/\alpha_2\beta_2^6 \text{Lys}$) ou Hb D ($\alpha_2\beta_2^6 \text{Val}/\alpha_2\beta_2^{121} \text{Gln}$) têm anemia hemolítica crónica e episódios vaso-oclusivos que causam isquémia e dores intensas.

A patofisiologia da anemia de células falciformes ou drepanocitose está relacionada com a diminuição da solubilidade da Hb S em condições de baixa tensão de oxigénio. As moléculas de Hb S-desoxi formam polímeros que se ligam à membrana do glóbulo vermelho, deformando-a [157] e tornando-a rígida, com o aspecto de uma foice (células falciformes). Estes glóbulos vermelhos rígidos vão obstruir a microcirculação, provocando

isquemia e necrose local, acompanhadas de dores intensas e danos cumulativos em vários órgãos.

A severidade clínica dos doentes heterozigóticos compostos Hb S / β -tal depende da mutação no alelo β -tal. A co-herança de α -tal aumenta o rácio superfície /volume, diminui a formação de polímeros, aumentando assim a sobrevivência dos glóbulos vermelhos. [189]. Vários estudos clínicos demonstraram uma correlação inversa entre os níveis de Hb F e complicações da drepanocitose, o que está relacionado com a formação de um híbrido assimétrico $\alpha_2\gamma\beta^S$ que inibe a polimerização da Hb S. Vários mecanismos levam a um aumento na produção de Hb F; na prática clínica são utilizados compostos de hidroxiureia e butirato que, na maioria dos doentes, duplicam os níveis basais de Hb F, com uma melhoria clara do quadro clínico [190-191].

6.3.2. Variantes de Hemoglobina Talassémicas

As **Hbs Lepore** são variantes de hemoglobinas com cadeias híbridas $\delta\beta$. Foram descritos três tipos de variantes de Hb Lepore em associação com fenótipos talassémicos: Hb Lepore-Washington-Boston ($\delta 87\text{Gln}-\beta 116\text{His}$), Hb Lepore-Baltimore ($\delta 68\text{Leu}-\beta 86\text{Ala}$), e Hb Lepore-Hollandia ($\delta 22\text{Ala}-\beta 50\text{Trh}$) [161, 192-193]. Os heterozigóticos têm parâmetros hematológicos similares aos da β -tal minor, mas com Hb A₂ normal, Hb F ligeiramente aumentada e 10-20% de Hb Lepore; os homozigóticos têm o fenótipo de talassemia intermédia e apenas Hb F e Hb Lepore (25-30%) [194, 163]. Hb Lepore-Washington-Boston é a mais comum e tem sido encontrada em várias populações do Mediterrâneo; em indivíduos Portugueses foi identificada apenas a Hb Lepore-Baltimore ($\delta 68\text{Leu}-\beta 84\text{Ala}$) [162]. Mais recentemente foi identificado um novo híbrido $\delta\beta$ do tipo Lepore, a $\delta^o\beta^+$ Senegalesa [195]. Estas variantes Lepore originam um fenótipo talassémico, pois são formadas por fusão de cadeias globínicas δ e β , sendo conservada apenas a região promotora do gene δ -globínico, que é transcrita a um nível de apenas 2% em relação ao gene β -globínico. Isto origina uma redução significativa na síntese de cadeias globínicas e resulta num fenótipo talassémico [163].

A **Hb Constant Spring** (α_2 CD142 TAA-AAA), devida a uma cadeia α_2 -globínica estendida em 31 aminoácidos, resultante da mutação T→A no codão de terminação é uma variante talassémica. É sugerido que o mRNA das cadeias mutadas seja muito instável, possivelmente devido à ausência da sequência estabilizadora 3'UTR que é transcrita inapropriadamente como resultado da mutação no codão de terminação. Os heterozigóticos apresentam α -tal, os homozigóticos apresentam uma talassemia mais severa que o esperado, dado que estão inactivos apenas dois dos quatro genes, e os heterozigóticos compostos com α^0 -tal apresentam uma doença da Hb H muito severa. [146].

As mutações β CD26 G→A (Glu-Lys) e β CD27 G→T (Ala-Ser), que originam as variantes **Hb E** e **Hb Knossos**, respectivamente, vão activar um local de *donor splice* adicional no primeiro exão, resultando num mecanismo de *splicing* alternativo. As mutações resultam em substituições de aminoácidos e, quando o local de *splicing* correcto é utilizado, são sintetizadas as variantes de Hb. Quando é usado o local de *splicing* alternativo não é sintetizada cadeia. A redução do *splicing* normal é a base molecular da β^+ -tal com fenótipo suave destas variantes [196]. A Hb E em heterozigotia ou homozigotia apresenta um fenótipo de anemia ligeira com microcitose e hipocromia, mas em associação com β -tal dá origem a um fenótipo de β -tal *major* [196]. A Hb Knossos em heterozigotia apresenta um fenótipo de talassemia minor [197].

O aminoácido que é alterado na variante talassémica **Hb Quong Sze** (α_2 CD125 T→C Leu-Pro) está situado na região da hélice H da cadeia α -globínica, um local crítico para o contacto das cadeias α - β [151]. A alteração de leucina por arginina impede a formação do dímero $\alpha\beta$ e conseqüentemente formação do tetrâmero, originando um fenótipo de α^+ -tal por um mecanismo pós-translacional [151]. A Hb Quong Sze está descrita como uma variante de Hb altamente instável, em que as cadeias α livres são rapidamente catabolizadas, pelo que não é detectada por meios electroforéticos nem cromatográficos [151].

7. Significância deste estudo

Em Portugal a causa mais frequente de anemia ligeira hipocrômica e microcítica (excluída a sideropenia) é a β -talassemia minor, cujo diagnóstico é simples porque se associa a um valor de Hb A₂ elevado. Os casos de hipocromia e microcitose com Hb A₂ normal podem ser devidos a α -talassemia (mais frequentemente aos genótipos ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$), ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$) ou ($-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$)), a variantes de hemoglobina, a $\delta\beta$ talassemias ou à associação de β -talassemia + δ -talassemia. Exceptuando as variantes de Hb detectáveis por electroforese de Hbs, focagem isoeléctrica ou por técnicas de HPLC, em todas as outras situações o diagnóstico de certeza só pode ser feito com o recurso a técnicas de biologia molecular, para o que é necessário uma estratégia bem definida, baseada na identificação dos diferentes genótipos. A identificação das bases moleculares das hipocromias e microcitoses com Hb A₂ normal não tem sido feito em Portugal de uma forma sistematizada e, para além de um inegável interesse antropológico, tem particular relevância na área da Hematologia para o diagnóstico e aconselhamento genético de indivíduos com Hemoglobinopatias.

8. Objectivos deste trabalho

Com este estudo pretende-se determinar as alterações moleculares responsáveis pela hipocromia e microcitose hereditárias num grupo indivíduos com Hb A₂ normal, nos quais for excluída sideropenia e em que não foram detectadas variantes de hemoglobina através de métodos cromatográficos e por focagem isoeléctrica. O conhecimento das bases moleculares destas hipocromias/microcitoses, e o perfil de prevalência na população em estudo, vai permitir estabelecer uma estratégia de investigação mais adequada, com grandes vantagens em termos de rentabilidade e eficácia de diagnóstico.

II – Material e Métodos

II – Material e métodos

1. Amostras

1.1. Selecção das amostras a estudar

Foram estudadas 57 amostras de indivíduos da consulta de Hematologia do Serviço de Hematologia do Centro Hospitalar de Coimbra (CHC) e de outros hospitais nacionais. As amostras foram seleccionadas de acordo com os parâmetros hematológicos apresentados sendo o critério de selecção a presença de hipocromia (HGM ≤ 27 pg) e microcitose (VGM ≤ 80 fL) associadas a um doseamento de Hb A₂ normal ($\leq 3,5\%$) e ausência de variantes de Hemoglobina detectadas por HPLC e/ou focagem isoeléctrica (IEF), após exclusão de sideropenia.

1.2. Colheita de sangue e parâmetros determinados

As amostras de sangue periférico foram colhidas em EDTA e mantidas a 4 °C até à extracção de DNA. Os valores dos parâmetros hematológicos, quantificação de Hb A₂ e Hb F e a focagem isoeléctrica foram fornecidos pelo serviço de rotina da Unidade de Anemias Congénitas e Hematologia Molecular do Serviço de Hematologia do Centro Hospitalar de Coimbra. Os parâmetros hematológicos foram obtidos com um contador de automático de células¹; a quantificação de Hb A₂ e Hb F foram determinadas através do HPLC - Variant™ System²; a IEF foi realizada usando gel de agarose comercial³, num gradiente de pH 6-8.

¹ Sysmex XT 20006

² Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

³ Pharmacia

2. Estudos moleculares

2.1. Extracção de DNA genómico

O DNA foi isolado dos leucócitos utilizando o método de fenol-clorofórmio ou um *kit* comercial⁴.

2.1.1. Extracção de DNA de amostras de sangue pelo método fenol-clorofórmio

O DNA está presente no núcleo das células eucarióticas como uma desoxirribonucleoproteína e pode ser isolado da célula por extracção seguida de separação das proteínas associadas. O método utilizado é baseado no descrito por Old e Higgs (1993) [198] para o isolamento de DNA de elevado peso molecular de células de mamíferos. O primeiro passo envolve a disrupção das células e a separação do núcleo dos restos celulares por centrifugação. O *pellet* nuclear é então lisado com SDS, um detergente que dissocia as proteínas do DNA e permite a sua digestão com uma forte enzima proteolítica, a proteinase K. Esta enzima e alguma proteína não digerida ainda ligada ao DNA é depois desnaturada com fenol e removida pelo procedimento da extracção com fenol. Neste procedimento, a mistura é agitada com fenol e as fases são separadas por centrifugação. O DNA é solúvel na fase aquosa, enquanto que as proteínas contendo os grupos aromáticos são solúveis na fase orgânica de fenol. O DNA é recuperado da fase aquosa por precipitação com etanol. A concentração de DNA é medida num espectrofotómetro de UV. O principal objectivo para a utilização deste método de extracção de DNA é a realização da técnica de *Southern Blot*, uma vez que fornece uma elevada concentração de DNA.

Protocolo de extracção de DNA por fenol

1. A 10-50 ml de sangue colhido em EDTA adicionou-se 0,1% NP 40⁵ frio (para +/- 5 ml de sangue usou-se um tubo de 15 ml e encheu-se com 0,1% NP 40).
2. Misturou-se bem por inversão e centrifugou-se durante 20 min. a 3200 rpm, 4 °C.

⁴ Amersham Biosciences

^{5,6} BDH Laboratory Supplies

3. O sobrenadante foi descartado e manteve-se o *pellet* nuclear. Adicionou-se 1 ml de tampão de lise (Tris 10 mM pH 8,0; NaCl 10 mM; EDTA 10 mM; SDS 0,5 %). Ressuspendeu-se com uma pipeta de Pasteur.
4. Adicionou-se mais 3 ml de tampão de lise e 1 µl de proteinase K (50 mg/ml) por cada ml de tampão de lise.
5. Misturou-se suavemente e incubou-se em banho a 37 °C cerca de 4 h, agitando ocasionalmente.
6. Foi adicionado ≈1/2 volume de Fenol Saturado com Tris (ver Protocolo de fenol saturado em Tris) e 1/2 volume de clorofórmio⁶.
7. Misturou-se suavemente o tubo por inversão durante cerca de 30 seg.
8. Centrifugou-se 20 min. a 3200 rpm, 20 °C.
9. O *pellet* foi descartado e reservou-se o sobrenadante.
10. Repetiu-se a extracção fenol-clorofórmio, misturou-se, centrifugou-se e reservou-se o sobrenadante (passos 6., 7., 8. (10 min) e 9.).
11. Adicionou-se igual volume de clorofórmio.
12. Centrifugou-se 10 min, 3000 rpm, 20 °C.
13. O sobrenadante foi recolhido e adicionou-se 1/10 do volume de NaCl 4 M. Adicionou-se 2x o volume de etanol⁷. Inverteu-se suavemente o tubo.
14. Centrifugou-se 15 min. a 3200 rpm, 4 °C. (Quando o *pellet* não era visível, manteve-se a 4 °C durante a noite).
15. Descartou-se o sobrenadante e secou-se (inversão do tubo) ≈2 h.
16. Adicionou-se ≈150 µl H₂O_d e ressuspendeu-se. Colocou-se a 4 °C durante 2 h.
17. Transferiu-se para um microtubo e determinou-se a concentração de DNA através de leitura da densidade óptica a 280 nm.
18. A solução aquosa de DNA foi conservada a 4 °C ou -20 °C.

Protocolo de Fenol Saturado em Tris

1. A um frasco de fenol⁸ de 100 g adicionou-se 16 ml de H₂O_d.
2. Colocou-se em banho a 37 °C para dissolver (cerca de 1 h).

⁷ ⁸ BDH Laboratory Supplies
⁹ Sigma

3. Adicionou-se Tris 1 M pH 7,5 até ao topo do frasco. Agitou-se, aguardou-se a separação das duas fases e removeu-se a superior. Repetiu-se este passo.
4. Repetiu-se 2 vezes com Tris 0,1 M pH 7,5, (não retirando a última fase superior).
5. Adicionou-se 0,1 g de hidroxiquinolina⁹.
6. Inverteu-se e removeu-se 1/3 da fase superior.
7. Guardou-se a 4 °C.

2.1.2. Extração de DNA de amostras de sangue por *kit* comercial

O DNA das amostras de sangue foi extraído utilizando o *Kit* comercial de extração *GFX Genomic*¹⁰, com vista à utilização em estudos posteriores baseados em PCR.

Este procedimento pode ser utilizado para 100 µl de sangue total. Fornece 2-4 µg de DNA por 100 µl de sangue total (o qual contém $\approx 1 \times 10^6$ de células nucleadas).

Adicionou-se 100 µl de sangue total a 500 µl de solução de extração. Após incubação procedeu-se a uma centrifugação de 1 min. a 8000 rpm. De modo a ligar o DNA à coluna repetiu-se a adição de solução de extração e a centrifugação. Para a lavagem do DNA adicionou-se solução de lavagem e centrifugou-se. Por fim eluiu-se o DNA com H₂Odd a 70 °C. Manteve-se o DNA a 4 °C.

2.2. Amplificação de DNA pelo método da *Polimerase Chain Reaction* (PCR)

A técnica de PCR foi utilizada para obter grandes quantidades de fragmentos de DNA em cadeia dupla.

Para os casos de amplificação específica de um gene ou exão, com vista a futura utilização em SSCP ou sequenciação, o fragmento específico foi flanqueado por dois oligonucleótidos sintético (*primers*) complementares às cadeias opostas do fragmento.

¹⁰ Amersham Biosciences

Também se utilizou a técnica de GAP PCR-multiplex para detectar a presença de algumas deleções conhecidas nos genes α -globínicos.

2.2.1. PCR *Multiplex*

Pesquisou-se a presença das deleções mais comuns em Portugal α^+ ($-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$) e das deleções α^0 ($--^{MED}$, $--^{20.5}$) através de uma única reacção de PCR, com base no procedimento descrito por Tan *et al* (2001) [199]. A representação esquemática da estratégia adoptada para a análise de α -talassemia com a reacção GAP-PCR *multiplex* encontra-se na figura II.1.

Cada reacção de 50 μ l era composta por 200 mM de cada dNTP¹¹, 1 X Q-solution¹², 2,5 U HotStarTaq DNApolymerase com o tampão fornecido¹³, 100-200 ng de DNA genómico e 10 *primers* a concentrações diferentes (Tabela II.1). As reacções ocorreram num termociclador Biometra¹⁴, com uma desnaturação inicial de 15 minutos a 96 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 98 °C durante 45 segundos, *annealing* a 60 °C durante 90 segundos, e extensão a 72°C durante 135 segundos. A reacção teve ainda uma extensão final de 5 minutos a 72 °C.

Os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados para cada junção da deleção, do gene α_2 -globínico controlo e da região 3'UTR do gene LIS1 estão indicados na Tabela II.1. A presença do fragmento do gene α_2 indica heterozigotia quando está também presente um alelo deleccionado. O fragmento 3'UTR do gene LIS1 actua como um controlo interno do sucesso da reacção de amplificação.

¹¹ Roche Diagnostic, Mannheim, Germany

^{12, 13} Qiagen, Hilden, Germany

¹⁴ Biometra, Göttingen, Germany

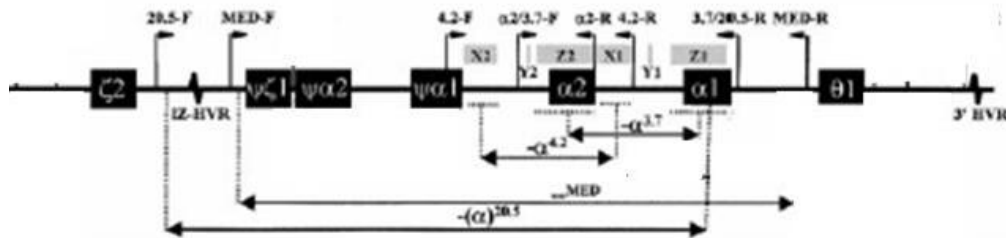


Figura II.1- Estratégia adoptada para a análise de α -talassemia com a reacção GAP-PCR *multiplex*. Representação esquemática do *cluster* de genes α -globínicos, com a indicação das extensões das 4 deleções estudadas e a posição relativa dos *primers* (excepto dos *primers* controlo LIS1-F e LIS1-R, que se localizam num cromossoma diferente). Estão também indicadas as zonas de sequências homólogas X, Y e Z e ainda as regiões hipervariáveis (HVRs). (Adaptado de Tan *et al* (2001) [199]).

Tabela II.1. Sequências dos *primers* para GAP-PCR *multiplex* para α -talassemia e os tamanhos dos fragmentos esperados. (Adaptado de Tan *et al* (2001) [199]).

<i>Primer</i>	Sequência oligonucleotídica (5'→3')	Concentração (μM)	Fragmento esperado (pb)
LIS1-F	ATA CCA TGG TTA CCC CAT TGA GC	0,5	Frag. LIS1 3'UTR (2350)
LIS1-R	AGG GCT CAT TAC ATG TGG ACC C	0,5	
α 2/3.7-F	CCC CTC GCC AAG TCC ACC C	0,2	Frag. junção $-\alpha^{3.7}$ (2022/2029)
3.7/20.5-R	AAA GCA CTC TAG GGT CCA GCG	0,2	
α 2/3.7-F	Como indicado acima	–	Gene α_2 (1800)
α 2-R	AGA CCA GGA AGG GCC GGT G	0,2	
4.2-F	GGT TTA CCC ATG TGG TGC CTC	0,5	Frag. junção $-\alpha^{4.2}$ (1628)
4.2-R	CCC GTT GGA TCT TCT CAT TTC CC	0,5	
20.5-F	GCC CAA CAT CCG GAG TAC ATG	0,2	Frag. junção $-(\alpha)^{20.5}$ (1007)
3.7/20.5-R	Como indicado acima	–	
MED-F	TAC CCT TTG CAA GCA CAC GTA C	0,2	Frag. junção $--^{MED}$ (807)
MED-R	TCA ATC TCC GAC AGC TCC GAC	0,2	

Frag.- fragmento

2.2.2. Amplificação dos genes globínicos α_1 e α_2

Os genes globínicos α_1 e α_2 foram amplificados por PCR, utilizando o mesmo *primer* directo para os dois genes (5' comum α 5'-GGGGTGCACGAGCCGACAGC-3'), e *primers* reversos específicos para cada gene (3' α_2 5'-CTCTCAGGACAGGGGATGGTTCAG-3' e 3' α_1 5'-AACCTGCATTGAATCTGAAAAGTC) [200] (figura II.2). O tamanho esperado para estes fragmentos é de 1326 pb (α_2) e de 1390 (α_1). Havendo alguma dificuldade na amplificação dos genes α -globínicos, devido à sua composição rica em guaninas e citosinas, utilizou-se o composto Betaína na PCR para facilitar essa acção. Segundo Henke *et al* (1997) [201], a betaína melhora a amplificação de genes ricos em sequências G+C, reduzindo a formação de estruturas secundárias causadas por essas regiões. Os genes α_2 e α_1 foram então amplificados em reacções separadas com a seguinte composição: *primers* directo e reverso a 25 μ M, MgCl₂ 1 mM, 200 μ M de cada dNTP, 2,5 U Taq polymerase¹⁵, tampão sulfóxido dimetil (DMSO) 1X (NH₄)₂SO₄ 32 mM; Tris-HCl 134mM pH 8,8; DMSO 20%; β -mercaptoetanol 20 mM), betaína¹⁶ 0,7 M e 100 ng de DNA genómico, num volume final de 50 μ l. As reacções ocorreram num termociclador Biometra, com uma desnaturação inicial de 15 minutos a 95 °C, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 1 minuto, *annealing* a 58 °C durante 1 minuto, e extensão a 72°C durante 90 segundos. A reacção teve ainda uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

2.2.3. Amplificação do gene β -globínico

Foram feitas duas abordagens diferentes à amplificação do gene β -globínico: amplificação de um único fragmento abrangendo todo o gene com o objectivo de sequenciação imediata, ou cada um dos seus três exões para uma prévia análise por SSCP.

O gene β -globínico foi amplificado em toda a sua extensão por PCR, utilizando o *primer* directo 5' β 2A 5'-CGATCTTCAATATGCTTAC-3' e o *primer* reverso 3' β 38 5'-GGGCCTATGATAGGG-3' (Fisher, C. 2004. Comunicação oral) (figura II.3). O tamanho

¹⁵ Roche Diagnostic, Mannheim, Germany

¹⁶ Sigma

esperado para este fragmento é de 2617 pb. A reacção utilizada foi: *primers* directo e reverso a 10 µM, MgCl₂ 1 mM, 200 µM de cada dNTP, 2,5 U Taq polymerase Platinum¹⁷ com o tampão fornecido e 100 ng de DNA genómico, num volume final de 50 µl. As reacções ocorreram num termociclador Biometra, com uma desnaturação inicial de 3 minutos a 95 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 1 minuto, *annealing* a 57 °C durante 1 minuto, e extensão a 72°C durante 2 minutos. A reacção teve ainda uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

Os três exões do gene β-globínico foram amplificados individualmente utilizando as seguintes condições: *primers* directo e reverso a 15 µM, 200 µM de cada dNTP, 2,5 U Taq polymerase¹⁸ com o tampão fornecido e 100 ng de DNA genómico, num volume final de 50 µl. As reacções ocorreram num termociclador Biometra, com uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95 °C, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 45 segundos, *annealing* a 54 °C durante 1 minuto, e extensão a 72°C durante 1 minuto, com uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. A sequência oligonucleotídica dos *primers* utilizados foi: directo (D): 5'-ACCTCACCTGTGGAGCCAC -3' e reverso (R): 5'-AAATAGACCAATAGGCAGA-3') (exão I); D: 5'-CCCTGGGCAGGTTGGTATCA-3' e R: 5'- ACATCAAGGGTCCCATAGAC-3' (exão II) e D: 5'-ACAGTGATAATTTCTGGGTT-3' e R: 5'- TTTAAATGCACTGACCTCCC -3' (exão III).

2.2.4. Amplificação do gene δ-globínico

O gene δ-globínico foi amplificado por PCR, em duas reacções: uma que amplifica um fragmento com os exões I e II (C 5'-GAACAGGGTTTCTGAGTCAAGACAC-3' e F 5'-GGAGAAGAGCAGGTAGGTA-3'), e outra que amplifica o exão III (H 5'-CTAGGAGACAGCCCATCATCAC -3' e I 5'-GTGTCACCCATTAATGCCTTGTA-3') [92] (figura II.C). O tamanho esperado para os fragmentos é de 766 e 796 pb. A reacção utilizada foi: *primers* directo e reverso a 25 µM, 200 µM de cada dNTP, 2,5 U Taq

¹⁷ Invitrogen

^{18, 19} Roche

polymerase¹⁹ com o tampão fornecido e 100 ng de DNA genómico, num volume final de 50 µl. As reacções ocorreram num termociclador Biometra, com uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95 °C, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 1 minuto, *annealing* a 52 °C (fragmento I)/ 54 °C (fragmento II) durante 1 minuto, e extensão a 72°C durante 90 segundos, extensão final de 10 minutos a 72 °C.

2.2.5. Pesquisa da deleção Corfu de 7,2 Kb

A deleção de 7,2 Kb no cluster β-globínico, conhecida como deleção Corfu foi pesquisada através de um GAP-PCR. O par de *primers* ψB 5'-ACAGAGAGTCAGAGATGACA-3' e I 5'-GTGTCACCCATTAATGCCTTGAC-3' foi utilizado para detectar a deleção, amplificando um fragmento de 764 pb. O par de *primers* C 5'-GAACAGGGTTTCTGAGTCAAGACAC-3' e G 5'-CAGTATTCTATGCCTCTCAT-3' foi utilizado como controlo, amplificando um fragmento de 1057 pb (superando a capacidade da reacção e não sendo detectado) [96] (figura II.4).

A reacção utilizada foi: os quatro *primers* a 25 µM, 200 µM de cada dNTP, 2,5 U Taq polymerase²⁰ com o tampão fornecido e 100 ng de DNA genómico, num volume final de 50 µl. As reacções ocorreram num termociclador Biometra, com uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95 °C, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 1 minuto, *annealing* a 58 °C durante 1 minuto, e extensão a 72°C durante 90 segundos. A reacção teve ainda uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

²⁰ Roche

2.3. Electroforese convencional dos produtos de PCR em gel de agarose

Os géis de agarose²¹ foram preparados com a concentração final de 1 %, em tampão TBE 0,5X (Tris 1,78 M; EDTA 0,04 M; ácido bórico 1,77 M). As electroforeses decorreram a 100 V em TBE 0,5X. Os produtos de PCR foram aplicadas no gel após adição de 1/5 de volume de tampão de carregamento (Ficol 400 15 %, azul de bromofenol 0,25 %, xileno cianol 0,25 %). De seguida o gel foi corado em brometo de etídio e visualizado sob luz U.V..

Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram determinados através de comparação de distância de migração das bandas correspondentes com as bandas de migração padrão do marcador utilizado.

²¹ Sigma

2.4. *Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP)*

A análise por SSCP tem vindo a ser o método mais utilizado na pesquisa dos fragmentos do gene onde se localizam as mutações, e baseia-se no facto de a molécula de DNA em cadeia simples (ssDNA) assumir uma estrutura tridimensional estabilizada por ligações intramoleculares. A configuração desta estrutura irá depender da sequência de nucleótidos do fragmento de DNA e influi na mobilidade electroforética dos fragmentos. Se estas estruturas forem submetidas a electroforese em gel não desnaturante, a sua mobilidade irá depender, não apenas do tamanho da cadeia de DNA, mas também da conformação que a molécula adquiriu. Se o fragmento de DNA em estudo apresentar uma sequência de nucleótidos que altere a configuração da molécula, ele vai apresentar uma migração diferente das cadeias normais [202].

A principal vantagem da análise por SSCP é a sua simplicidade e relativa sensibilidade. Esta permite detectar 70-95% de mutações nos produtos de PCR de tamanho igual ou inferior a 200 pb. A sensibilidade diminui com o aumento do tamanho do produto amplificado, sendo inferior a 50% em fragmentos de tamanho superior a 400 pb.

Os fragmentos de DNA a estudar foram amplificados por PCR e desnaturados em presença de formamida e por acção do calor. A formamida é um agente que impossibilita o emparelhamento das bases dos ácidos nucleicos (agente desnaturante). Seguidamente as cadeias de ssDNA foram submetidas a electroforese num gel de poliacrilamida, não desnaturante, num aparelho de electroforese vertical. Este gel é constituído por uma parte superior menos concentrada, gel de empacamento, onde as amostras são aplicadas e entram no gel e uma parte inferior, gel de separação, que vai permitir a separação das cadeias desnaturadas. Após electroforese, as cadeias de DNA foram detectadas por coloração de nitrato de prata.

Protocolo do SSCP

I - Preparação do gel de separação

1. Preparou-se o gel como descrito na Tabela II.2:

Tabela II.2- Composição do gel de separação para a técnica de SSCP.

Composição	Quantidade (ml)
40% Acrilamida:Bisacrilamida ²² 37,5:1	2,5
TBE 10X ^a	0,5
Glicerol ²³	1,0
Água destilada	6,0

a- Tris 1,78 M, EDTA 0,04 M, ácido bórico 1,77 M

2. Misturou-se bem e reservou-se 1,5 ml da mistura para posterior preparação do gel de separação.
3. Adicionou-se:

Persulfato de Amônio 25%	16 µl
TEMED ²⁴	10 µl
4. Pipetou-se 4-5 ml para cada conjunto de vidros previamente montado.
5. Cobriu-se com H₂O_d e deixou-se polimerizar.

II - Preparação do gel de empacamento

1. Aos 1,5 ml da mistura anterior adicionou-se 1,5 ml de água destilada.
2. Misturou-se bem e adicionou-se:

PSA 25%	8 µl
TEMED	5 µl
3. Retirou-se a água que cobria o gel de separação e lavou-se a superfície com TBE 0,5X.
4. Pipetou-se 2 ml da solução sobre o gel de separação.
5. Colocou-se os pentes e deixou-se polimerizar.

²² Quantum Appligene

²³ GIBCOBRL, Life Technologies

²⁴ Sigma

III - Preparação das amostras

1. Misturou-se 4 µl de produto de PCR com 4 µl de *Stop solution* (10 ml de formamida desionizada; 10 mg de azul de bromofenol; 10 mg de xileno cianol; 250 µl de EDTA.Na₂ 0,5 M; 100 µl de SDS 10%).
2. Desnaturou-se 5 min a 90 °C.
3. Colocou-se em gelo até aplicar.

IV – Electroforese

1. Retirou-se os pentes e lavou-se muito bem os poços com TBE 0,5 X.
2. Montou-se o gel no tanque de electroforese²⁵.
3. Aplicou-se 8 µl de amostra por poço.
4. Correu-se a electroforese 16 h a 80 V.

Após a electroforese, o gel foi corado pela técnica de *silver staining*.

V – Coloração de *silver staining*

1. Colocou-se o gel em 100 ml de ácido acético 10% e incubou-se 20 min. com agitação.
2. Retirou-se o fixador e lavou-se 3 vezes 2 min. com água destilada.
3. Incubou-se 30 min. com agitação em 100 ml de reagente de prata (AgNO₃ 5x10⁻⁴ M; formaldeído 0,05%).
4. Lavou-se 30 seg. com água destilada.
5. Adicionou-se 100 ml de reagente de carbonato de sódio (Na₂CO₃ 0,05 M, formaldeído 0,05%; tiosulfato de sódio 0,002 mg/ml) e agitou-se até se começarem a visualizar as bandas.
6. Retirou-se esse reagente e juntou-se 100 ml de reagente fresco.
7. Quando as bandas se apresentaram bem visíveis, parou-se a reacção de revelação com 100 ml de ácido acético 10%.
8. Registaram-se os resultados por fotografia.

²⁵ Bio-Rad Mini PROTEAN II

2.5. Mapeamento genético do *cluster* de genes α -globínicos

O mapeamento genético foi realizado segundo o protocolo proposto por Old e Higgs [198], com ligeiras modificações.

I. Digestão enzimática do DNA genómico, electoforese e *Southern blot*

1. Foram digeridos 5 μ g de DNA com a enzima de restrição específica e o tampão adequado, segundo as instruções do fabricante.
2. Correram-se os fragmentos de DNA resultantes e o marcador de peso molecular $^{35}\text{S}^{26}$ num gel de agarose²⁷ 0,8 % à temperatura ambiente, num tanque de electroforese horizontal, à voltagem constante de 50 V, ON. Utilizou-se tampão 1x TAE (Tris Acetato 2 M; NaAc 1 M; EDTA 10 mM, pH 8,3) para a preparação da agarose e para a electroforese.
3. Corou-se o DNA no gel com brometo de etídio (1 mg/L) e fotografou-se sob luz UV.
4. Colocou-se o gel numa solução desnaturante de NaOH 1 M durante 1 h. Seguidamente lavou-se com H₂O e colocou-se em solução neutralizante (Tris-HCl 1 M, NaCl 3 M, pH 8,0) durante 2 h. Estes procedimentos foram realizados à temperatura ambiente e com agitação suave.
5. A transferência do DNA por capilaridade para uma membrana de nitrocelulose²⁸ foi realizada utilizando solução SSC 6X (SSC 20 X: NaCl 15 M, Citrato de sódio 1,5 M, pH 7,0) durante um período de 16-24 h.
6. Após a transferência o DNA foi fixado à membrana por exposição a luz UV e mantido a 72 °C durante 1h.

II. Endonucleases de restrição e sondas de DNA

As sondas utilizadas neste estudo foram fragmentos do *cluster* de genes α -globínicos, previamente clonados em vectores plasmídicos (pBR 322). Após clonagem,

²⁶ AmershamBiosciences

²⁷ Sigma

²⁸ Zeta probe GT genomic, Biorad

foram digeridas 20-30 µg de DNA plasmídico com 1-2 U/µg de enzima de restrição apropriada durante 1 h a 37 °C, seguida de electroforese em gel de agarose a 1%. A banda correspondente à sonda específica foi cortada do gel e o DNA foi eluído com o *Kit Gene Clean*²⁹ segundo as instruções do fabricante.

Para determinar o número de genes α -globínicos utilizaram-se as enzimas *Bam* HI³⁰ e *Bgl* II³¹, com a sonda α (1,6 kb *pst* I α_1) e a sonda ζ (1,8 kb *Sac* I ζ_1) [203], respectivamente.

Para determinar a presença ou ausência do local HS-40 utilizou-se a enzima *Hind* III³², e hibridaram-se os fragmentos com as sondas HS-40 e NK I/SP I.

Para determinar o tamanho das HVRs utilizaram-se as enzimas *Alu* I³³ e *Hinf* I³⁴, com as sondas 5' HVR e 3' HVR, respectivamente [204].

III. Marcação radioactiva das sondas

As sondas foram marcadas radioactivamente utilizando o *Kit Megaprime DNA Labeling Systems*³⁵ com os reagentes e as instruções do fabricante.

A 20-30 ng de DNA adicionou-se a solução de *primers* e desnaturou-se durante 5 min a 95 °C. De seguida, adicionou-se o tampão de marcação (contendo os nucleótidos), o ³²P-dCTP (20 µCi) e a enzima *Klenow*, num volume total de 50 µl. Manteve-se a 37° C, 10 min. Os nucleótidos não incorporados foram removidos da sonda por filtração com H₂Od através de uma coluna de G-50 Sephadex³⁶. A radioactividade foi determinada com um contador *Geiger*. As sondas marcadas foram armazenadas a -20 °C.

²⁹ Bio 101, Bio-Rad

³⁰⁻³⁴ BioLabs-New England

³⁵ Amersham Biosciences

³⁶ Sigma,

³⁷ Fluka

IV. Pré-hibridação da membrana

A membrana foi humedecida em SSC 2 X e colocada num recipiente de vidro cilíndrico. Adicionou-se 4-5 ml de tampão de hibridação (formamida³⁷ 50%; SSC 3 X; 1 X Denhardt's (0.02% BSA; Ficoll 400³⁸; polivinilpirrolidina³⁹), SSDNA⁴⁰ sonificado 20 µg/ml e de sulfato de Dextran⁴¹ 6%. Incubou-se 15-30 min. a 42 °C com rotação contínua.

V. Hibridação da membrana

Desnaturou-se a sonda marcada a 100 °C durante 5 min, e adicionou-se a 10 ml de tampão de hibridação. Esta mistura foi adicionada à membrana e manteve-se em rotação contínua a 42 °C num mínimo de 16 h.

VI. Lavagem e autoradiografia da membrana

As membranas foram lavadas em 2 X SSC à temperatura ambiente durante 30 min, e em seguida com uma solução de lavagem quente (SSC 0,1%, SDS 0,1%, a 65 °C). A radioatividade da membrana foi monitorizada com um contador *Geiger* e as lavagens só terminaram quando estavam presentes apenas 1-2 counts/seg. As membranas foram secas ao ar e expostas a um filme Kodak BioMax MS⁴² a -70 °C durante 2-4 dias. Os filmes foram revelados num processador Kodak X-ray film⁴³.

Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram determinados através de comparação de distância de migração das bandas correspondentes com as bandas de migração padrão do marcador utilizado.

³⁸ Sigma

³⁹ BDH Laboratory Supplies

⁴⁰ Sigma

⁴¹ Amersham Pharmacia

⁴² Sigma

⁴³ X-Omat 20 Processor, Eastman Kodak

2.6. Sequenciação do DNA amplificado por PCR

Utilizou-se a sequenciação automática de DNA para identificar mutações pontuais do gene β -globínico, também para identificar os *breakpoints* exactos da deleção Corfu no gene δ -globínico e ainda para pesquisar mutações não deleccionais nos dois genes α -globínicos.

I- Purificação de PCR – EXOSAP-IT

Adicionou-se 2 μ l de ExoSAP-it⁴⁴ a 8 μ l de produto de PCR e desnaturou-se (37 °C durante 15 min, 80° C durante 15 min).

II- Reacção de Sequenciação

As reacções de sequenciação realizadas foram específicas para cada gene a sequenciar, α_2 e α_1 (Tabela II.3), δ ou β -globínico (Tabela II.4).

Tabela II.3- Composição da reacção de sequenciação dos genes globínicos α_2 e α_1 .

Componentes da reacção de sequenciação para os genes α_2 e α_1	Quantidades (μ l)
DNA purificado	7
Primer 2 μ M	1,6
Betaína 5 M	2,4
<i>Big Dye</i> ^a	4
H ₂ O	5

a- *BigDye Terminator V1.1- Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystems

⁴⁴ USB

Tabela II.4- Composição da reacção de sequenciação dos genes globínicos delta e beta.

Componentes da reacção de sequenciação para os genes δ e β	Quantidades (μ l)	Quantidades (μ l)
	gene δ	gene β
DNA purificado	7	4
Primer	1,6 (2 μ M)	4 (0,8 μ M)
<i>Half Big Dye</i> ^a	4	4
<i>Big Dye</i>	4	4
H ₂ O	3,4	4

a- Tris 200 mM, pH 9,0, MgCl₂ 5 mM.

Os *primers* de sequenciação utilizados estão listados na Tabela II.5 e a representação esquemática da sua localização nas figuras II.2, II.3 e II.4. O programa de sequenciação utilizado para todos os genes foi: desnaturação inicial a 96° C, 96 °C- 3 min., 96 °C -10 min., 54 °C - 5 min. , 60 °C, 4 min, 25 ciclos.

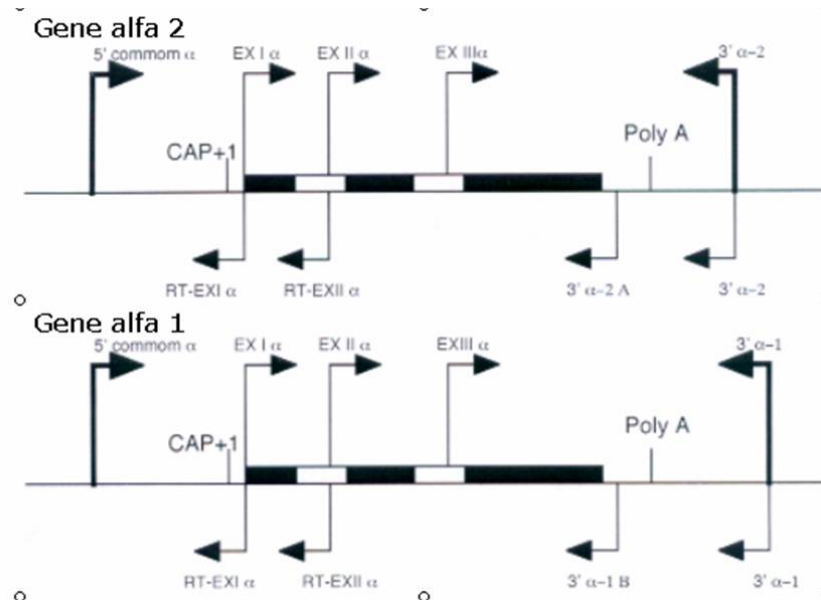


Figura II.2. Representação esquemática das posições relativas dos *primers* utilizados para a sequenciação dos genes globínicos α_2 e α_1 . Também se encontra os *primers* de amplificação (setas espessas).

Tabela II.5- Lista dos *primers* utilizados na sequenciação dos genes α_2 , α_1 , β e δ .

Gene	Primer de sequenciação	Sequência oligonucleotídica (5'→3')
Alfa ^(a)	5' comum α ^(D)	GGG GTG CAC GAG CCG ACA GC
	3' α_2 ^(R)	CTC TCA GGA CAG GGG ATG GTT CAG
	3' α_1 ^(R)	AAC CTG CAT TGA ATC TGA AAA GTC
	3' α -2A ^(R)	TTA TTC AAA GAC CAG GAA GGG CCG
	3' α -1B	CGC CCA CTC AGA CTT TAT TCA AAG
	EX I α ^(D)	TCC CCA CAG ACT CAG AGA GAA C
	EX II α ^(D)	ATG TTC CTG TCC TTC CCC AC
	EX III α ^(D)	AGT TCC TGG CTT CTG TGA GC
	RT-EX I α ^(R)	GTG GGT TCT CTC TGA GTC TGT
	RT-EX II α ^(R)	TGT GGG TCC GGG CGG G
Beta ^b	Ex1.1L ^(D)	GAG CCA AGG ACA GGT ACG G
	3' β_2 ^(R)	CAA AGG ACT CAA AGA ACC TC
	Ex2.1L ^(D)	AGA CTC TTG GGT TTC TGA
	3' β_9 ^(R)	CAT TCG TCT GTT TCC CAT T CT A
	JMO15 ^(D)	CAA TGT ATC ATG CCT CTT TGC ACC
	3' β_8 ^(R)	GCA GCC TCA CCT TCT TTC ATG G
Delta ^c	C ^(D)	GAA CAG GGT TTC TGA GTC AAG ACA C
	F ^(R)	GGA GAA GAG CAG GTA GGT A
	H ^(D)	CTA GGA GAC AGC CCA TCA TCA C
	I ^(R)	GTG TCA CCC ATT AAT GCC TTG TAC
	$\psi\beta$ ^(D)	ACA GAG AGT CAG AGA TGA CA

D-*primer* directo, R-*primer* reverso.

a- Adaptado de Old *et al* (1993) [198] e Viprakasit, V., Fisher, C. e Higgs, D.R. 2004. Comunicação oral.

b- Fisher, C. 2004. Comunicação oral.

c- Adaptado de De Angioletti *et al* (2002) [96].

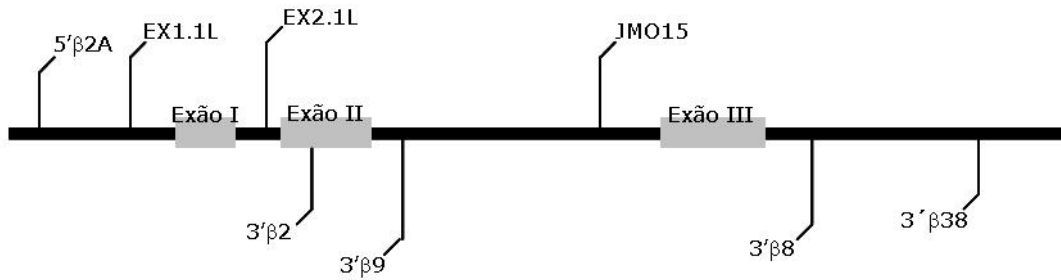


Figura II.3. Representação esquemática das posições relativas dos *primers* utilizados para a sequenciação do gene β-globínico. Também são apresentados os *primers* de amplificação (5'β2A e 3'β38).

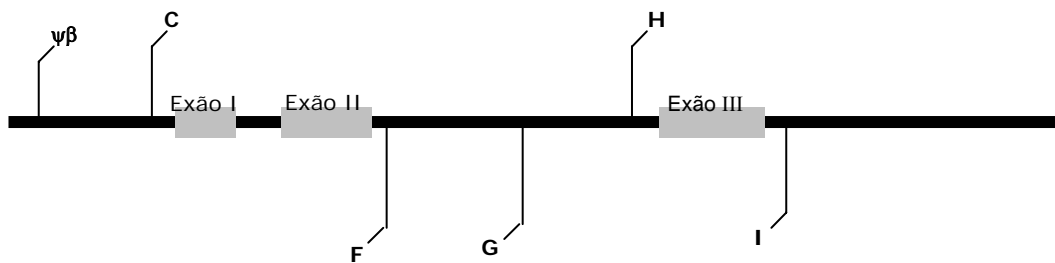


Figura II.4. Representação esquemática das posições relativas dos *primers* utilizados para a amplificação e sequenciação do gene δ-globínico, e para detecção da deleção de Corfu.

III- Reacção de precipitação, Clean-up Big-Dye

1. Ao tubo com a reacção de sequenciação adicionou-se 288 µl da mistura :
 - 200 µl de etanol absoluto⁴⁵ à temperatura ambiente
 - 8 µl acetato de sódio 3 M, pH 5,2.
 - 80 µl H2O
2. Manteve-se a -20°C durante 10 min.
3. Centrifugou-se 20 min. a 13000 rpm e eliminou-se o sobrenadante de etanol sobre papel de celulose.

⁴⁵ Merck

4. Adicionou-se 200 µl de etanol 70% gelado e centrifugou-se 5 min. a 13000 rpm.
5. Eliminou-se sobre papel de filtro o sobrenadante de etanol e fez-se um pulso até atingir 5000 rpm.
6. Eliminou-se o etanol restante com pipeta e ressuspendeu-se em TSR ou congelou-se a -20° C até à aplicação no aparelho de sequenciação.

IV- Ressuspensão em TSR - *template suspension reagent*

1. Adicionou-se 25 µl de TSR⁴⁶ ao *pellet* e incubou-se 10 min para hidratar. Agitou-se por acção de *vortex* e centrifugou-se durante alguns segundos.
2. Desnaturou-se 3 min. a 94 °C. Agitou-se por acção de *vortex* e centrifugou-se durante alguns segundos.
3. As amostras foram colocadas no tabuleiro de sequenciação do Sequenciador AbiPrism 310⁴⁷.

^{46, 47} Applied Biosystems

2.7. Digestão do DNA genómico com enzimas de restrição

As endonucleases de restrição são enzimas que reconhecem e cortam sequências específicas de DNA. Cada enzima reconhece uma sequência específica de quatro a oito nucleótidos, cortando o DNA nesse local. O tamanho dos fragmentos de DNA obtidos por digestão com estas enzimas depende da frequência com que os locais específicos de restrição ocorrem na cadeia de DNA. Sob condições óptimas uma unidade de enzima de restrição é normalmente definida como a quantidade necessária para digerir completamente 1 µg de DNA, num volume de reacção de 25 µl, em 60 minutos [205].

Alteração da sequência de nucleótidos através de por exemplo, mutações pontuais, inserções, deleções podem levar à criação de locais de reconhecimento para endonucleases de restrição ou anular locais previamente existentes. A sequência em estudo pode ser amplificada por PCR e digerida com a enzima de restrição que reconheça a alteração em causa. Os fragmentos são separados, de acordo com o seu tamanho, num gel de agarose e visualizados com brometo de etídio.

As digestões realizadas em fragmentos dos genes α e β -globínicos pretenderam confirmar mutações sugeridas por SSCP e/ou sequenciação.

Protocolo

Foi digerido um fragmento do gene β -globínico com a enzima *Bsab* I (5 U de enzima, tampão adequado 1X, 15 µl de produto de PCR, num volume total de 30 µl durante 16 h a 60 °C). Foi digerido um fragmento do gene α_2 -globínico com a enzima *Msp* I (5 U de enzima, tampão adequado 1X, 15 µl de produto de PCR, num volume total de 30 µl durante 16 h a 37 °C).

Os fragmentos digeridos foram separados num gel de agarose a 3% e visualizados com luz ultra violeta.

2.8. Síntese de cadeias globínicas: estudo *in vitro*

O diagnóstico da maioria das talassemias pode ser obtido a partir das condições clínicas e hematológicas e confirmado ao nível molecular. No entanto, existem formas heterozigóticas de β -talassemia, as chamadas β -talassemia silenciosas, nas quais o nível de Hb A₂ é normal. Adicionalmente, em casos de α -talassemia, utilizando análises de *Southern blot* ou métodos de GAP-PCR, não são detectadas as formas não deleccionais. Deste modo, esta técnica de síntese de cadeias globínicas pode revelar alterações quantitativas na síntese de cadeias globínicas α ou β . Pode ainda indicar a presença de um estado de heterozigotia devido a um rácio anormal entre as cadeias α e β [205-208].

Princípio

Para detectar um desequilíbrio na produção de cadeias globínicas, deve ser medido o rácio das novas cadeias sintetizadas, por exemplo, nos reticulócitos do sangue periférico. Os reticulócitos são incubados durante uma hora com um isótopo radioactivo (leucina ³H) e outros componentes necessários à síntese de globinas *in vitro*. No fim desse período as globinas são precipitadas do lisado celular com acetona acidificada, e a amostra pode ser armazenada. Depois, as cadeias globínicas são separadas por cromatografia de coluna, eluídas por gradientes salinos e colhidas em fracções. A radioactividade incorporada em cada fracção é medida num contador de cintilações líquidas.

Protocolo

1. Colocou-se 10 ml de sangue fresco num tubo de 15 ml e centrifugou-se a 4 °C, 10 min., 3000 rpm.
2. Decantou-se o plasma e removeu-se cuidadosamente o *buffy coat*.
3. Adicionou-se ao tubo solução Salina de Reticulócitos (NaCl 130 mM; KCl 5 mM; MgCl₂ 7,4 mM) a 4 °C e centrifugou-se 10 min. a 2000 rpm, 4 °C.
4. Descartou-se o sobrenadante e retirou-se de novo o *buffy coat*. Adicionou-se solução Salina de Reticulócitos e centrifugou-se. Repetiu-se esta lavagem duas vezes, a ultima das quais com uma centrifugação de 30 min.

5. Retirou-se 0,5 ml da fracção superior do tubo (reticulócitos) para um tubo de 50 ml e adicionou-se 1 ml de Mistura de Incubação (mistura de aminoácidos em solução Salina de reticulócitos: Ala 2 mM, Arg 0,5 mM, Asp 3 mM, Asn 2 mM, Gly 5 mM, Glu 8 mM, His 2,5 mM, Ile 0,03 mM, Lys 1,8 mM, Met 0,3 mM, Phe 1,6 mM, Pro 1,4 mM, Ser 1,6 mM, Thr 1,7 mM, Trp 0,3 mM, Tyr 0,8 mM, Cys 0,4 mM, pH 7,75; MgCl₂ 0,005 M; Tris-HCl 0,032 M pH 7,75; citrato tri-sódico 0,002 M; NaHCO₃ 0,002 M).
6. Adicionaram-se ainda 2 gotas de sulfato ferroso 1 mg/ml e 50 µCi de leucina ³H. Manteve-se a 37 °C, 1 hora.
7. Adicionou-se solução Salina de Reticulócitos a 4 °C (até 45 ml do tubo de 50 ml). Centrifugou-se 10 min, 4 °C, 3000 rpm.
8. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 2 ml de H₂Odd.
9. Adicionou-se acetona ácida 2% (-20 °C) até 45 ml do tubo.
10. Manteve-se a -20 °C, 20-30 min. ou mais, até serem bem visíveis os flocos de globina e heme.
11. Centrifugou-se 1 min. a 3000 rpm. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se acetona gelada. Agitou-se e repetiu-se a centrifugação. Repetiu-se 2 vezes a lavagem com acetona.
12. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se éter dietílico (- 20 °C).
13. Centrifugou-se 1 min, 4 °C, 3000 rpm, e deixou-se secar as globinas (em forma de pó).
14. A amostra foi dialisada e aplicada na coluna de cromatografia para a separação das cadeias de globina.
15. As fracções recolhidas foram lidas num contador de cintilações.

III – Resultados

III – Resultados

Os 57 indivíduos estudados foram divididos em dois grupos, por comparação dos parâmetros hematológicos obtidos com os valores médios estabelecidos para a mesma idade e sexo (Tabela III.1). As amostras apresentam Hb A₂ normal e por HPLC e focagem isoelétrica (IEF) não foi detectada qualquer banda indicativa da presença de variante de Hb.

Tabela III.1. Parâmetros hematológicos estabelecidos de acordo com sexo e idade. Adaptado de Daliman, 1977 [209]

Idade	Hemoglobina g/dL		VGM fL		HGM pg	
	Média	-2 SD	Média	-2 SD	Média	-2 SD
1 mês	14.0	10.0	104	85	34	28
2 meses	11.5	9.0	96	77	30	26
3 - 6 meses	11.5	9.5	91	74	30	25
0.5 - 2 anos	12.0	10.5	78	70	27	23
2 - 6 anos	12.5	11.5	81	75	27	24
6 - 12 anos	13.5	11.5	86	77	29	25
12 - 18 anos - F	14.0	12.0	90	78	30	25
- M	14.5	13.0	88	78	30	25
18 - 49 anos - F	14.0	12.0	90	80	30	26
- M	15.5	13.5	90	80	30	26

VGM- volume globular médio, HGM- hemoglobina globular média, SD- desvio padrão

Grupo I: 26 indivíduos adultos e 8 crianças com valores de VGM e HGM nos limites inferiores da normalidade (Tabela III.2);

Grupo II: 18 adultos e 5 crianças com valores de VGM e HGM significativamente inferiores aos considerados normais (Tabela III.3).

1. Pesquisa das deleções mais comuns nos genes α -globínicos

As amostras do Grupo I e Grupo II foram inicialmente testadas para as deleções α mais comuns: α^+ -tal: $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$; α^0 -tal: $--^{MED}$ e $-(\alpha)^{20.5}$ através de Gap-PCR *multiplex*.

Após electroforese dos produtos amplificados verificou-se no Grupo I, com 34 amostras, a presença de 11 amostras com a deleção $-\alpha^{3.7}$ em heterozigotia ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$), 1 com a deleção $-\alpha^{4.2}$ em heterozigotia ($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$) e 22 amostras que não apresentavam as deleções estudadas (Tabela III.2). No Grupo II, com 23 amostras, 3 eram homozigóticas para a deleção $-\alpha^{3.7}$ ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$), 1 heterozigótica composta para as deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$), uma heterozigótica para $-\alpha^{3.7}$ ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) e 18 amostras não apresentaram nenhuma das deleções estudadas (Tabela III.3). Em nenhum dos grupos foram encontradas amostras com a deleção de 20.5 kb ou com a deleção Mediterrânea. Na figura III.1 encontra-se o resultado da electroforese de produtos de amplificação do PCR *multiplex*, exemplificando os diferentes genótipos encontrados nas amostras estudadas.

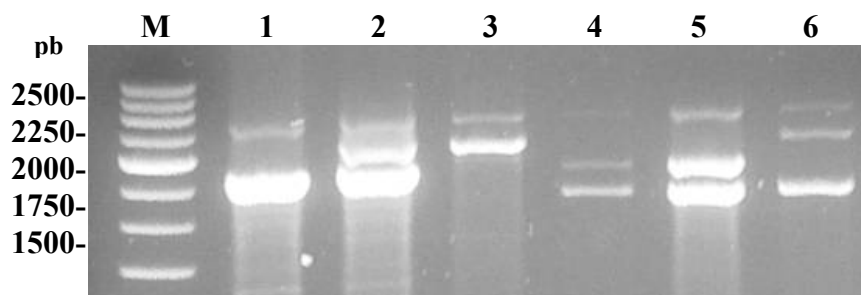


Figura III.1. Resultados do PCR *multiplex* em gel de agarose 1%. **1**: normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$); **2**: deleção de 3.7 Kb em heterozigotia ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$); **3**: deleção de 3.7 Kb em homozigotia ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$); **4**, **5**: deleção de 4.2 Kb em heterozigotia ($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$); **6**: heterozigotia composta para as deleções de 3.7 e 4.2 Kb ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$), **M**: marcador de peso molecular XVI, Roche.

Tabela III.2. Indivíduos do Grupo I

Indivíduo	Idade (anos)/ sexo	Hb g/dL	VGM fL	HGM pg	Hb A ₂ %	Hb F %	Genótipo confirmado
1	4 / M	13,0	69,6	24,3	2,8	1,0	- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
2	6 / M	11,5	71,0	24,0	2,8	<1	N
3	7 / M	11,7	79,0	25,0	3,5	<1	N
4	12 / M	15,8	78,0	25,0	2,9	<1	N
5	13 / M	12,2	79,0	26,0	2,6	<1	- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
6	13 / M	14,1	78,0	26,0	2,8	<1	N
7	13 / M	10,5	79,0	26,0	3,0	<1	N
8	13 / M	11,4	77,0	28,0	2,9	<1	N
9	19 / F	13,1	77,3	25,1	2,7	<1	- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
10	19 / M	15,0	76,0	25,0	2,7	1,0	N
11	19 / M	14,6	76,7	26,9	3,1	<1	- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
12	20 / F	14,3	79,0	26,0	2,6	<1	- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
13	20 / F	15,8	79,0	27,0	3,5	<1	N
14	20 / F	13,4	78,0	25,0	2,8	<1	N
15	20 / F	11,2	77,0	25,0	2,3	<1	N
16	20 / M	14,1	80,0	27,0	2,9	<1	N
17	20 / M	12,1	77,0	26,0	2,8	<1	- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
18	21 / F	11,3	77,0	28,0	3,3	<1	N
19	21 / M	14,3	80,0	24,0	2,4	<1	- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
20	21 / M	15,3	79,0	26,0	2,8	<1	N
21-D	23 / M	14,5	77,0	24,0	2,9	1,6	$\alpha\alpha^T/\alpha\alpha$
22	24 / F	12,1	78,0	24,0	2,1	<1	- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
23	25 / M	14,7	80,0	26,0	3,2	<1	N
24	25 / M	15,2	77,0	24,0	2,4	<1	- $\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$
25	27 / F	12,7	80,0	27,0	2,8	<1	N
26	27 / M	15,1	79,0	24,0	3,4	<1	N
27	27 / M	14,7	76,0	26,0	2,7	<1	- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
28	28 / M	16,4	78,0	29,0	2,9	<1	N
29	30 / M	15,0	79,4	27,1	2,6	<1	- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
30	33 / F	10,9	80,0	26,0	2,7	<1	N
31	38 / M	14,5	77,0	25,0	2,9	<1	N
32-D	40 / F	13,0	80,0	26,0	2,5	<1	$\alpha\alpha^T/\alpha\alpha$
33	44 / F	10,8	78,0	25,0	2,5	<1	N
34	45 / M	14,1	79,0	24,0	1,7	<1	- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$

VGM- volume globular médio, HGM- hemoglobina globular média. Hb- hemoglobina,

N- sem mutações para os genes estudados, F-feminino, M-masculino

Tabela III.3. Indivíduos do Grupo II

Indivíduo	Idade (anos)/ sexo	Hb g/dL	VGM fL	HGM pg	Hb A ₂ %	Hb F %	Genótipo confirmado
1	5 / M	10,1	69,0	18,0	2,1	<1	N
2	9 / M	10,8	56,0	18,0	2,6	<1	N
3	9 / M	10,9	61,5	18,7	2,8	<1	N
4	13 / F	10,5	69,5	21,0	2,2	<1	N
5	13 / M	12,5	66,0	21,0	3,7	<1	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$
6	18 / M	13,3	72,0	24,0	1,7	<1	N
7	19 / F	11,3	74,0	24,0	2,3	<1	N
8	20 / M	12,0	73,0	24,0	2,5	1,4	N
9	20 / M	14,1	65,0	21,0	2,8	<1	N
10	22 / M	10,1	69,0	18,0	2,1	<1	N
11-B	23 / M	14,3	76,3	23,1	2,6	<1	Hb Plasencia/N
12-D	26 / M	14,4	69,0	22,0	2,4	2,5	$\alpha\alpha^{T}/--$ ^(a)
13	27 / M	12,6	74,0	23,0	2,2	<1	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$
14	30 / F	11,9	68,6	21,1	2,8	<1	N
15	30 / M	14,7	71,0	22,0	2,4	<1	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$
16-E	35 / M	13,9	72,5	22,9	2,7	<1	N
17	40 / F	11,3	72,0	23,0	2,9	<1	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$
18-A	40 / M	12,8	60,0	20,0	2,7	<1	$\delta\text{Corfu}+\beta\text{-IVS-I-1}/\text{N}$
19-B	40 / M	14,5	81,0	23,0	2,5	<1	Hb Plasencia/N
20	44 / M	13,0	68,0	22,0	2,7	<1	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
21	44 / M	13,3	69,0	21,0	2,6	<1	N
22-C	57 / M	15,0	76,0	24,0	2,7	<1	$\alpha_2\text{-IVS-II-1 (-G)}/\text{N}$
23	62 / M	15,1	67,0	22,0	2,6	<1	N

VGM- volume globular médio, HGM- hemoglobina globular média, Hb- hemoglobina,

N- sem mutações para os genes estudados, F-feminino, M-masculino, ^(a)- deleção a confirmar

Nas amostras do Grupo I e II, despistadas as mutações α -delecionais mais frequentes, foram pesquisadas mutações no gene β -globínico e no gene δ -globínico (amostra 18-A). Nas amostras do Grupo II foram também pesquisadas grandes deleções no *cluster* de genes α -globínicos e mutações pontuais nos dois genes α - globínicos.

2. Pesquisa de mutações pontuais nos genes β -globínicos

Nas amostras do Grupo I e II em que a pesquisa das deleções alfa mais comuns foi negativa, foram pesquisadas mutações pontuais no gene β -globínico.

Nos fragmentos analisados por SSCP, após amplificação específica por PCR de fragmentos do gene β -globínico para cada um dos três exões, detectou-se uma alteração de mobilidade no exão I idêntica à de um controlo com heterozigotia para a mutação β -IVS-I-1 ($G \rightarrow A$), na amostra 18-A (Tabela III.3 e III.4). Não foram detectados outros padrões de migração anormal (na figura III.2 estão exemplificados os resultados obtidos).

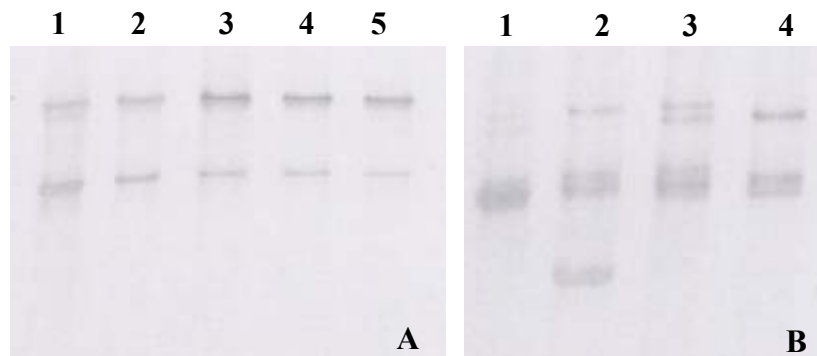


Figura III.2. **A-** Resultados de SSCP para o fragmento que engloba o exão II. **1-4:** amostras com mobilidade idêntica à da amostra controlo; **5:** controlo sem mutações no fragmento exão II. **B-** Resultados de SSCP para o fragmento que engloba o exão I. **1:** controlo com a mutação β IVS-I-1 ($G \rightarrow A$); **2:** controlo com a mutação β -IVS-I-1 ($G \rightarrow A$)/CD2 ($C \rightarrow T$); **3:** amostra do indivíduo 18-A; **4:** controlo sem mutações no fragmento exão I.

A mutação detectada no SSCP (Figura III.2B) foi posteriormente confirmada por digestão com a enzima de restrição *BsaB* I. O resultado da digestão do fragmento do gene β -globínico que engloba o exão I, da amostra de DNA do indivíduo 18-A, é apresentado na figura III.3. A enzima reconheceu a mutação $G \rightarrow A$ (IVS-I-1) presente em heterozigotia e cortou o fragmento de 673 pb em 373 e 300 pb.

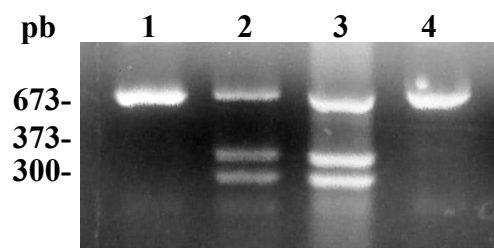


Figura III.3. Digestão *BsaB* I. **1:** não digerido; **2:** controlo IVS-I-1 (G→A); **3:** indivíduo 18-A com a mutação IVS-I-1 (G→A) (673, 373 e 300 pb); **4:** controlo normal (673 pb).

Nas restantes amostras foi sequenciado o gene β -globínico, previamente amplificado um fragmento de 2617 pb que engloba toda a extensão do gene (figura III.4). Não foram detectadas mutações nos genes β -globínicos nas amostras sequenciadas.

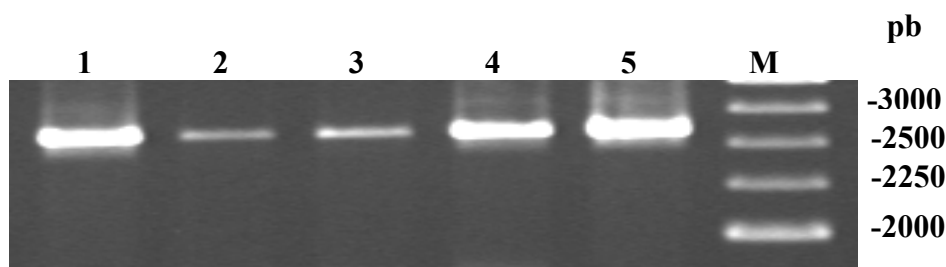


Figura III.4. Resultados da electroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação de todo o gene β -globínico. **1-5:** gene β -globínico (2617 pb); **M-** marcador de peso molecular XVI, Roche.

3. Pesquisa de mutações nos genes δ -globínicos

Para pesquisa de mutações pontuais por sequenciação do gene δ -globínico da amostra 18-A (Tabelas III.3 e III.4), amplificaram-se, por PCR, 2 fragmentos de DNA: o fragmento I com 766 pb, que inclui os exões I e II e o fragmento II com 796 pb, que inclui o exão III (figura III.5). Não foram detectadas quaisquer mutações através da sequenciação, pelo que se suspeitou da existência de uma deleção e pesquisou-se a mais frequente, a deleção Corfu de 7,2 Kb. Esta pesquisa foi realizada através de um GAP-

PCR e foi confirmada a sua presença, através da amplificação de um fragmento de 764 pb (figura III.6).

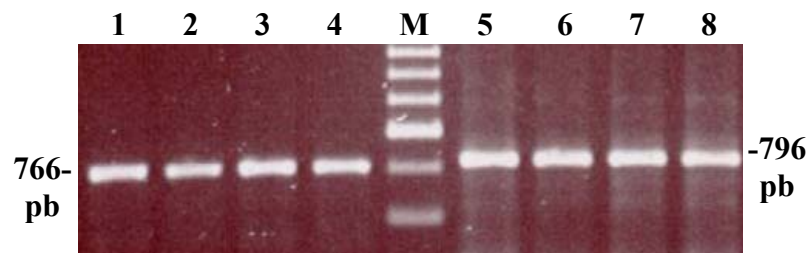


Figura III.5. Resultados da electroforese em gel de agarose 1% dos produtos de amplificação do gene δ -globínico. 1-4: fragmento I (exões I e II do gene δ) (766 pb); 5-8: fragmento II (exão III do gene δ) (796 pb); M- marcador de peso molecular XVI, Roche.

De seguida, foram identificados, por sequenciação, os *breakpoints* da deleção Corfu detectada anteriormente por GAP-PCR. A deleção inicia-se na região intergénica $\beta\psi$ - δ , a -5896 nt do *Cap Site* do gene δ (coordenada 46640 - NCIB UO1317) e termina no final do IVS-II do gene δ -globínico, a +820 nt (coordenada 53851 - NCIB UO1317), deixando intacto apenas o terceiro exão do gene δ .

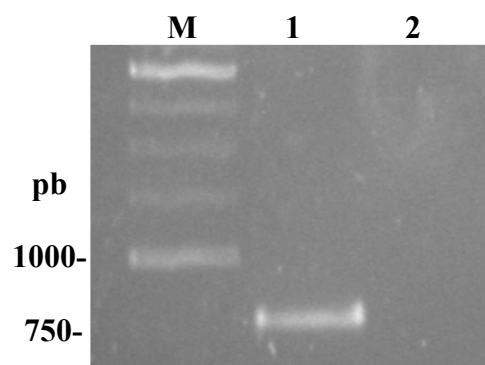


Figura III.6. Resultados da electroforese em gel de agarose 1% dos produtos de amplificação do GAP-PCR para a detecção da deleção Corfu. 1: amostra do indivíduo 18-A com deleção de Corfu (764 pb); 2: controlo negativo; M- marcador de peso molecular XVI, Roche.

4. Pesquisa de grandes deleções no *cluster* de genes α -globínicos

A pesquisa de grandes deleções no *cluster* de genes α -globínicos nas amostras do Grupo II foi feita por mapeamento genético por *Southern Blot*.

Os resultados obtidos por hibridação com a sonda α (1,6 kb *pst* I α_1), marcada com ^{32}P , dos fragmentos de DNA digerido com a enzima de restrição *Bam* HI, confirmaram os resultados previamente obtidos por GAP-PCR: em 5 das 23 amostras está presente uma das deleções α -globínicas mais comuns. Na presença de um genótipo alfa normal deverá ser detectado um fragmento de 14,0 Kb; se estiver presente a deleção de 3,7 e a de 4,2 Kb serão detectados também os fragmentos de 10,3 e 9,8 Kb, respectivamente (figura III.7).

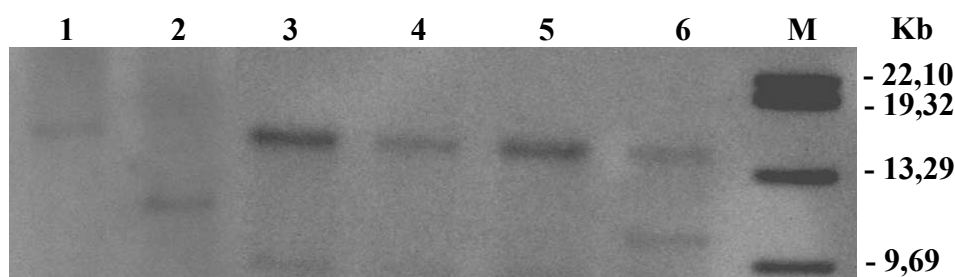


Figura III.7. Autorradiografia com os fragmentos específicos *Bam* HI - α . **1, 3-5**: indivíduos sem grandes deleções nos genes α -globínicos (banda de 14,0 Kb); **2**: indivíduo homocigótico para a deleção de 3,7 Kb (banda de 10,3 Kb); **6**: indivíduo heterocigótico para a deleção de 3,7 Kb (bandas de 14,0 e 10,3 Kb); **M**: marcador ^{35}S , AmershamBiosciences.

A hibridação com a sonda ζ (1,8 kb *Sac* I ζ_1) dos fragmentos de DNA digerido com a enzima de restrição *Bgl* II, revelou a presença do polimorfismo *Bgl* II em heterocigotia nas amostras 32-D e 16 (Tabela III.2) e em homocigotia na amostra 12-D (Tabela III.3 e III.4). Esta hibridação reconfirmou as deleções $-\alpha^{3.7}$ já identificadas anteriormente. Na hibridação com a sonda ζ as amostras de indivíduos normais digeridas com a enzima *Bgl* II apresentam duas bandas ζ específicas: uma (12,6 Kilobases) contém o gene α_2 , o $\psi\alpha_1$ e a maioria do ζ_1 ; a outra (9,5-12,5 Kb) inclui o restante ζ_1 e a totalidade do gene ζ_2 . Este último fragmento inclui a região hipervariável (HVR) interzeta, e por isso, o seu tamanho pode diferir de um cromossoma para o outro. A presença do polimorfismo do local de restrição *Bgl* II entre os genes ζ_1 e $\psi\alpha_1$ dá origem a um novo fragmento específico- ζ de 5,2

Kb e um específico- α de 7,4 Kb. Deste modo, a sonda ζ detecta um fragmento variável de 9,5-12,5 e outro de 5,2 Kb. A deleção de 3,7 Kb remove o local *Bgl* II entre os dois genes alfa sendo o fragmento normal de 12,6 Kb substituído por um de 16,0 Kb (figura III.8).

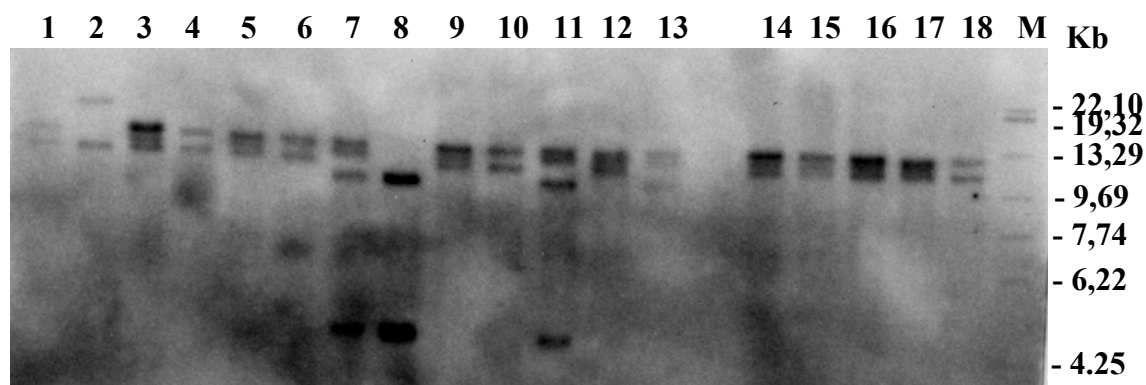


Figura III.8. Autoradiografia com os fragmentos específicos *Bgl* II - ζ . **1, 3-6, 9-10, 12-18**: indivíduos sem deleções nos genes α -globínicos (bandas de 12,6 e 9,5-12,5 Kb); **2**: indivíduo homocigótico para a deleção de 3,7 Kb (bandas de 16,0 e 9,5-12,5 Kb); **7, 11**: indivíduos heterocigóticos para o polimorfismo *Bgl* II (bandas de 12,6; 9,5-12,5 e 5,2 Kb); **8**: indivíduo homocigótico para o polimorfismo *Bgl* II (bandas 9,5-12,5 e 5,2 Kb); **M**: marcador ^{35}S , AmershamBiosciences.

Os resultados da hibridação com as sondas HS-40 e NK I / SP I dos fragmentos resultantes da digestão com a enzima de restrição *Hind* III revelaram que o local HS-40 está presente em todas as amostras, não sendo detectada nenhuma grande deleção naquela região (figura III.9).

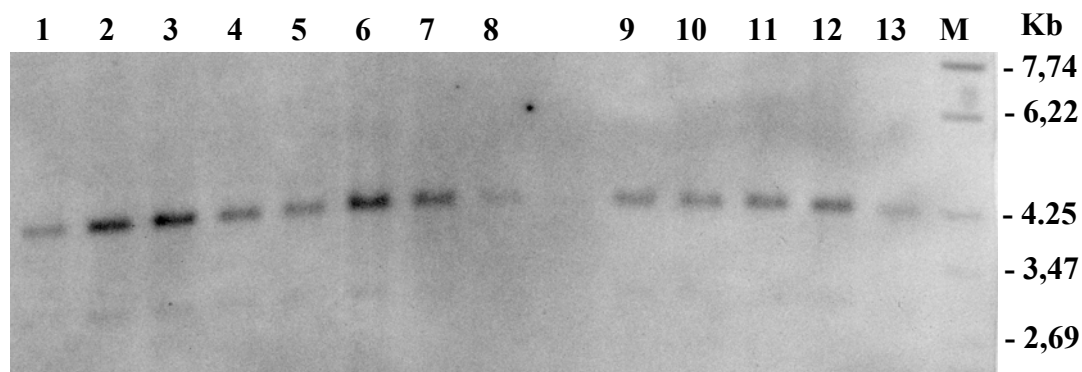


Figura III.9. Autoradiografia com os fragmentos específicos *Hind* III -HS-40, NK I / SP I. **1-13**: indivíduos sem deleção no local HS-40; **M**: marcador ^{35}S , AmershamBiosciences.

Os resultados obtidos por hibridação das sondas 5'HVR e 3'HVR com os fragmentos de DNA digeridos com as enzimas de restrição *Alu* I e *Hinf* I, respectivamente, mostraram que a maioria das amostras apresenta dois fragmentos em cada região HVR estudada (na figura III.10 estão apresentados os resultados de alguns dos indivíduos estudados). O indivíduo 14 (Tabela III.3) apresentou um fragmento para a região 5' HVR e dois fragmentos para a região 3' HVR. Os indivíduos 12-D e 23, Tabela III.3, apresentaram apenas um fragmento em cada uma das regiões hipervariáveis.

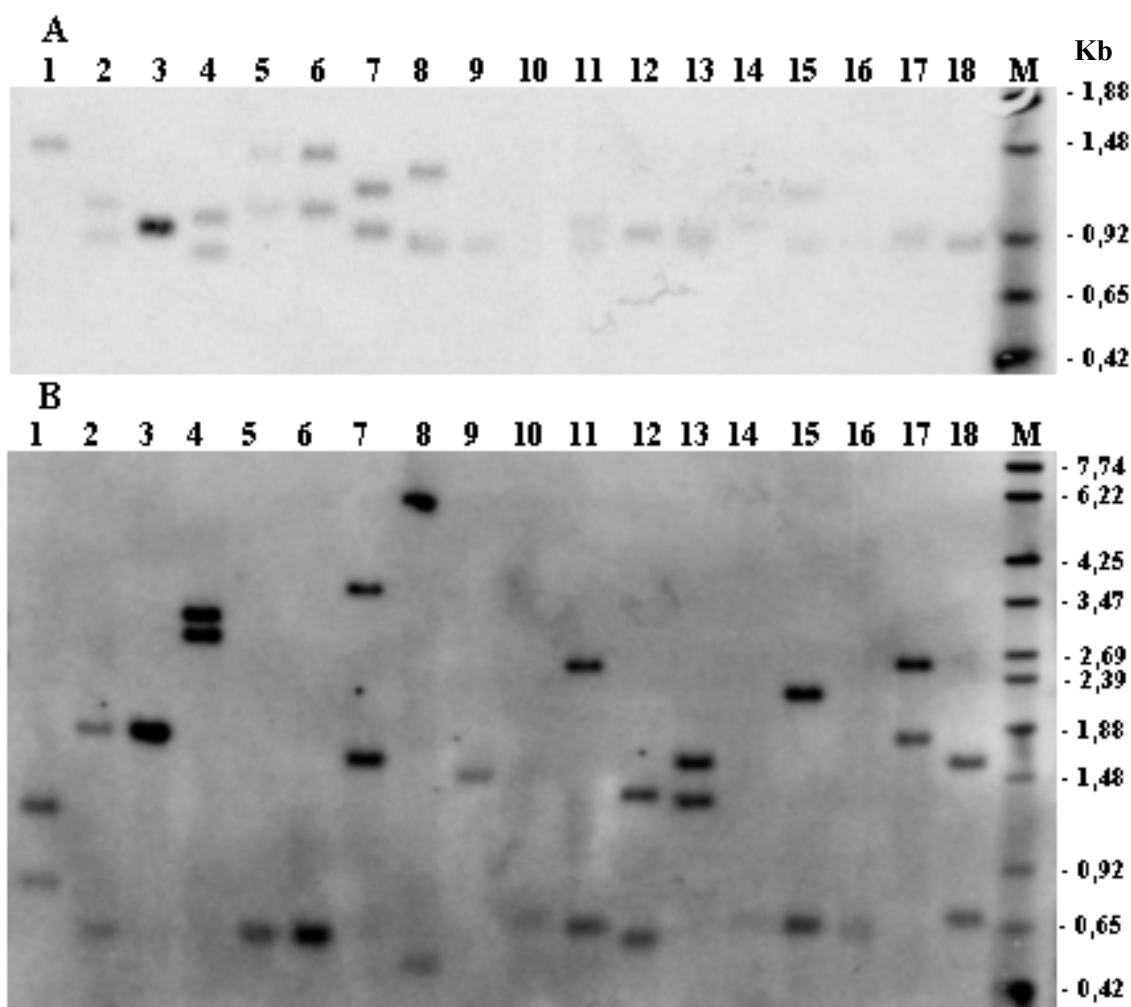


Figura III.10. Autoradiografia **A**: fragmentos específicos *Alu* I - 5'HVR; Autoradiografia **B**: fragmentos específicos *Hinf* I - 3'HVR. Estão representados os mesmos indivíduos nas duas hibridações. **2, 4, 7- 8, 11, 15**: indivíduos com dois fragmentos para as regiões 5' e 3' HVR; **1, 12-13, 17-18**: indivíduos com um fragmento para a região 5' HVR e dois fragmentos para a região 3' HVR; **5, 6, 14**: indivíduos com dois fragmentos para a região 5' HVR e um para a região 3' HVR. **3**: indivíduo com apenas um fragmento para cada região HVR. **M**: marcador ^{35}S , AmershamBiosciences.

5. Pesquisa de mutações não deleccionais nos genes α -globínicos

Nas amostras em que os parâmetros hematológicos não foram justificados pelos resultados obtidos na pesquisa das deleções mais comuns, nem de grandes deleções, procedeu-se à amplificação de fragmentos dos genes α -globínicos para sequenciação. O tamanho dos fragmentos obtidos em resultado da amplificação por PCR dos genes globínicos α_1 e α_2 foi de 1326 pb (α_2) e de 1390 (α_1), respectivamente (figura III.11).

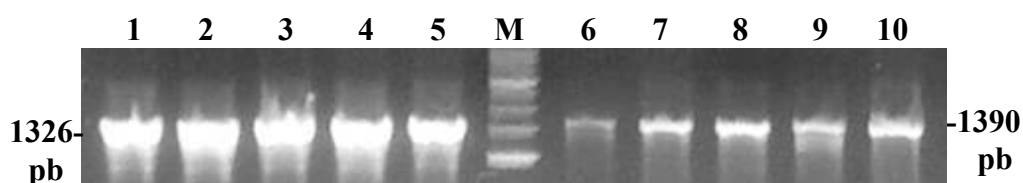


Figura III.11. Resultados da electroforese em gel de agarose 1% dos produtos de amplificação dos genes α_2 e α_1 -globínicos. **1-5:** gene α_2 -globínico (1326 pb); **6-10:** gene α_1 -globínico (1390 pb); **M-** marcador de peso molecular XVI, Roche.

A sequenciação dos genes α -globínicos das amostras 11-B e 19-B (filho e pai; Tabela III.3 e III.4) evidenciou uma mutação no codão 125 (CTG→CGG), no terceiro exão do gene α_2 . A referida mutação foi verificada com o *primer* directo e com o reverso, e está presente em heterozigotia nas duas amostras (figura III.12). Esta mutação leva à alteração do aminoácido leucina por arginina e origina a variante Hb Plasencia.

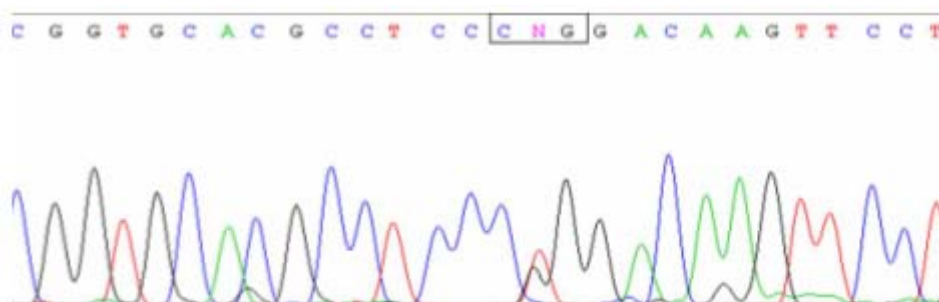


Figura III.12. Sequenciação do gene α_2 -globínico, apresentando a mutação de T→G no codão 125 do terceiro exão, em heterozigotia. O codão 125 está indicado com um rectângulo.

A digestão com a enzima de restrição *Msp* I de um fragmento do gene α_2 destas amostras confirmou a presença da mutação codão 125 T→G (CTG→CGG). A existência dos fragmentos 327, 204, 190, 151, 123 e 70 Kb, juntamente com os fragmentos 327, 190, 151 e 70 de um fragmento normal, indicam a presença da referida mutação em heterozigotia (figura III.13).

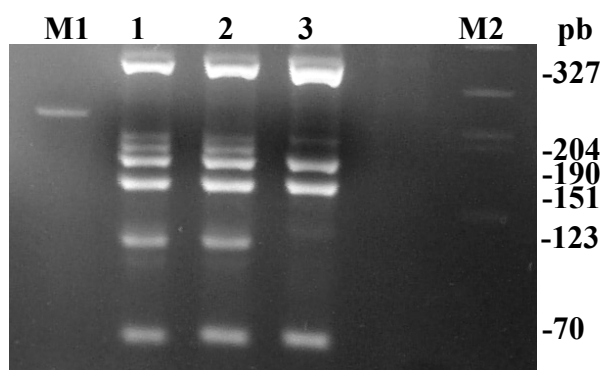


Figura III.13. Digestão *Msp* I. **1**: propósito 11-B; **2**: pai 19-B; **3**: controlo normal; **M1**: marcador de peso molecular 250 pb, Roche ; **M2**: marcador de peso molecular pBR328/*BglII/HinfI*.

A sequenciação dos genes α -globínicos do indivíduo 22-C (Tabela III.3 e III.4) evidenciou uma mutação que dá origem à *frameshift* mostrada na figura III.14. A mutação, que consiste na deleção do primeiro nucleótido (-G) do segundo intrão do gene α_2 -globínico [(-G) IVS-II-1], foi verificada com os *primers* directo e reverso, e está presente em heterozigotia.

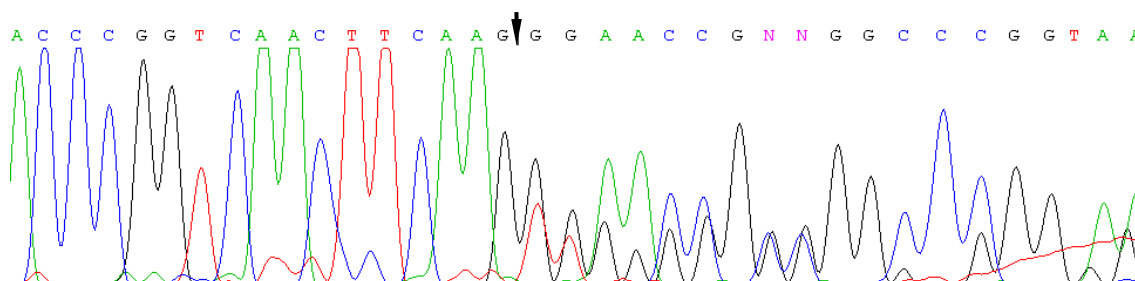


Figura III.14. Sequenciação do gene α_2 -globínico apresentando a mutação (-G) IVS-II-1. O início da *frameshift* originada pela deleção de um nucleótido (-G) está assinalado por uma seta na figura. A sequência original após o último codão (AAG) do segundo exão, AAGgtgagcgg, e é alterada para AAG-tgagcgg.

A sequenciação dos genes α -globínicos da amostra 12-D (Tabela III.3 e III.4) evidenciou uma mutação no segundo exão do gene α_1 . A mutação consiste numa pequena deleção/inserção: 9 nucleótidos consecutivos (codões 82-84) foram deleccionados e 5 outros (TGCAC) foram inseridos nesse local. A referida mutação foi verificada com *primers* directo e reverso, e está presente com um padrão de homozigotia no propósito e em heterozigotia na mãe e no irmão (32-D e 21-D; Tabela III.3 e III.4) (figura III.15).

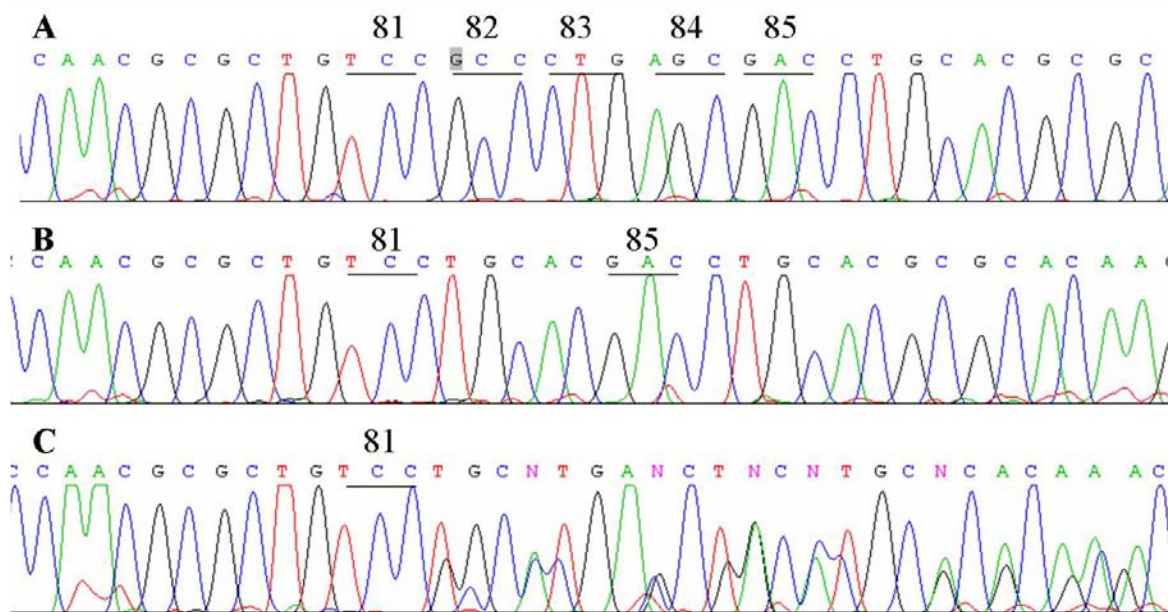


Figura III.15. Sequenciação do gene α_1 -globínico, apresentando a deleção/inserção no exão 2. **A-** Sequência normal com os codões 81, 82, 83, 84 e 85 indicados. **B-** Sequência nucleotídica do propósito, deleção dos codões 82, 83 e 84 e inserção de 5 nucleótidos TGCAC, em homozigotia. **C-** Sequência nucleotídica da mãe e do irmão, onde a mesma mutação está presente em heterozigotia, originando uma *frameshift*. A mutação foi verificada com *primer* directo e reverso.

Nas restantes 14 amostras sequenciadas (1-4, 6-10, 14, 16, 20-21 e 23 da Tabela III.3) não se verificou qualquer mutação, para além dos polimorfismos frequentes nestes genes.

Tabela III.4. Casos particulares de Propósitos do Grupo II

Caso	Idade (anos)/ sexo	Hb g/dL	VGM fL	HGM pg	Hb A ₂ %	Hb F %	Genótipo confirmado
Caso A							
18-A Propós.	40 / M	12,8	60,0	20,0	2,7	<1	δCorfu+β-IVS-I-1/N
Filho	20 / M	11,0	60,0	18,0	5,8	<1	β-IVS-I-1
Caso B							
19-B Propós.	23 / M	14,3	76,3	23,1	2,6	<1	Hb Plasencia/N
11-B Pai	40 / M	14,5	81,0	23,0	2,5	<1	Hb Plasencia/N
Caso C							
22-C	57 / M	15,0	76,0	24,0	2,7	<1	α ₂ -IVS-II-1 (-G)/N
Caso D							
12-D Propós.	26 / M	14,4	69,0	22,0	2,4	2,5	αα ^T /-- ^(a)
32-D Mãe	40 / F	13	80,0	26,0	2,5	<1	αα ^T /αα
21-D Irmão	23/ M	14,5	77,0	24,0	2,9	1,6	αα ^T /αα
Caso E							
16-E Propós.	35 / M	13,9	72,5	22,9	2,7	<1	N
Pai	M	16,4	97,4	35,1	3,2	<1	N
Mãe	F	12,9	83,1	29,3	3,0	<1	N
Irmã I	25 / F	13,2	94,1	33,1	3,1	<1	N
Irmã II	25 / F	13,4	81,2	28,8	3,3	<1	N
Esposa	25 / F	11,4	63,8	21,2	3,4	6,6	deleç. δβ-Spanish

VGM- volume globular médio, HGM- hemoglobina globular média, Hb- hemoglobina,

N- sem mutações para os genes estudados, F-feminino, M-masculino. ^(a)- deleção a confirmar

6. Determinação do rácio de cadeias α/β globínicas

O perfil da síntese de cadeias globínicas, utilizado para detectar desequilíbrios na produção de cadeias globínicas, do indivíduo 16-E (Tabela III.3 e III.4) é apresentado na figura III.16. A incorporação do isótopo radioactivo por cada fracção recolhida na eluição da cromatografia de coluna demonstrou um rácio de cadeias α/β de 0,83.

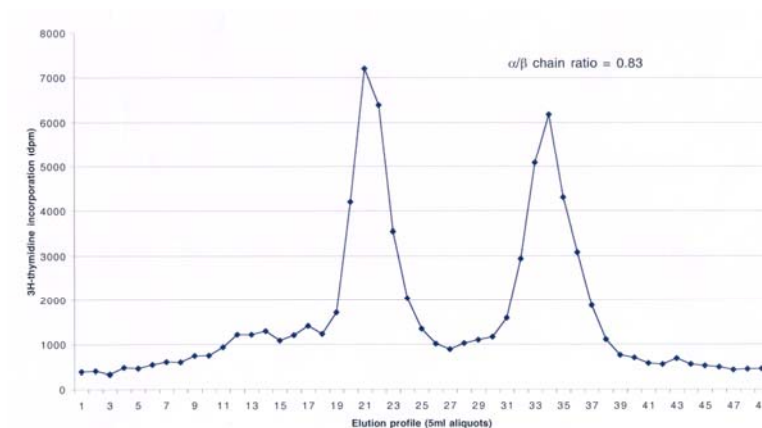


Figura III.16. Perfil da síntese de cadeias globínicas do propósito 16-E. É apresentada a radioactividade incorporada do isótopo em decaimentos por minuto (dpm) em função de cada alíquota eluída na cromatografia. O rácio de cadeias α/β obtido foi de 0,83.

IV – Discussão

IV – Discussão

Nos indivíduos com hipocromia e microcitose sem anemia ou com anemia ligeira, um doseamento aumentado de HbA₂ é suficiente para fazer o diagnóstico de β-talassemia. Nos casos em que a percentagem de Hb A₂ é normal, excluída a sideropenia, podem surgir dificuldades no diagnóstico, o que é particularmente relevante em casais com hipocromia/microcitose que necessitam de aconselhamento genético para prevenção das formas graves de hemoglobinopatias. O conhecimento das bases moleculares destas hipocromias/microcitoses e da sua prevalência na população, permite estabelecer uma estratégia de investigação adequada, aumentando a rentabilidade e eficácia no diagnóstico. Este estudo pretendeu determinar as alterações moleculares responsáveis pela hipocromia e microcitose hereditárias com doseamento de Hb A₂ normal e em que não foi detectada a presença de variantes de Hb por HPLC e focagem isoeléctrica (IEF), depois de excluída a presença de sideropenia., num grupo de 57 indivíduos da Região Centro de Portugal (excepto 1 com origem espanhola).

Grupo I

A pesquisa das deleções mais comuns do *cluster* de genes α-globínicos (-α^{3.7}, -α^{4.2}, --^{MED} e -α^{20.5}) revelou que no Grupo I, formado por 34 indivíduos com valores de VGM e HGM nos limites inferiores da normalidade, 11 apresentam a deleção de 3,7 Kb em heterozigotia e 1 a deleção de 4,2 Kb em heterozigotia. Os 12 indivíduos portadores destas deleções têm parâmetros hematológicos nos limites inferiores da normalidade estabelecidos para a idade e sexo, o que é esperado para este tipo de mutações α-talassémicas em heterozigotia. A pesquisa de mutações não deleccionais nos restantes elementos do grupo revelou em dois indivíduos, mãe e filho (21-D e 32-D), uma mutação em heterozigotia no gene α₁-globínico [deleção(CDs 82-84)/inserção(5 nts)]. Nos restantes 20 indivíduos do Grupo I foi ainda pesquisada a presença de mutações pontuais do gene β-globínico que pudessem justificar os valores hematológicos observados. Exemplo desse tipo de mutações seria a mutação β(-101 C→T), na região CAC distal, relativamente frequente nas populações Mediterrânicas, em que os heterozigóticos têm um fenótipo β-tal “silencioso” com valores de VGM, HGM e HbA₂ nos limites do normal [63]. Não foi encontrada nenhuma mutação β-tal neste grupo de amostras.

Em resumo: no Grupo I, com 34 amostras que apresentavam parâmetros hematológicos nos limites inferior da normalidade, 12 tinham heterozigotia para uma mutação deleccional α^+ -tal e duas apresentaram heterozigotia para uma inserção/deleção no gene α_1 ($\alpha\alpha^T$ -tal) não descrita anteriormente.

O aprofundamento do estudo molecular neste tipo de amostras, tal como o que foi realizado para detectar a existência de alguma mutação pontual no gene β -globínico, é obrigatório nos casos de aconselhamento genético se os dois elementos de um casal têm hipocromia/microcitose. Quando disponível, para orientação do estudo, pode determinar-se a razão de síntese das cadeias globínicas α/β , que em indivíduos normais é aproximadamente igual a 1. Um desvio desta razão normal pode indicar qual a cadeia que está a ser sintetizada em menor quantidade.

Grupo II

A pesquisa das deleções α -globínicas mais comuns ($-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $--^{MED}$ e $-\alpha^{20.5}$) nos 23 indivíduos pertencentes ao Grupo II, com hipocromia e microcitose mais acentuadas, revelou que 3 eram homozigóticos $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$, 1 heterozigótico composto $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ e um heterozigótico $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$. Os genótipos apresentados são compatíveis com os parâmetros hematológicos dos respectivos indivíduos (Tabela III.3), à excepção do indivíduo 20 (Tabela III.3) que apresenta a deleção de 3,7 Kb em heterozigotia.

As restantes 18 amostras do Grupo II não apresentaram nenhuma das deleções pesquisadas tendo sido prosseguido o estudo, juntamente com a amostra 20 (Tabela III.3), com a pesquisa de outro tipo de mutações α - ou β -globínicas. Em 4 destas amostras foram detectadas mutações que serão discutidas individualmente (Casos A, B, C e D). As restantes 14 amostras, que não apresentaram alterações, serão discutidas no final, sendo uma delas (Caso E), pelas suas características, também discutida individualmente.

1. Discussão de 5 Casos do Grupo II

Caso A

Indivíduo do sexo masculino, com Hb 12,8 g/dL, VGM 60 fL, HGM 20 pg, Hb A₂ 2,7% e Hb F 0,7% (18-A das Tabelas III.3 e III.4). O estudo familiar revelou que o seu filho, também hipocrômico e microcítico, mas com Hb A₂ 5,6 %, tinha uma β -talassemia *minor* por heterozigotia para a mutação β -IVS-I-1 (G→A). A pesquisa desta mutação na amostra do propósito confirmou também uma heterozigotia β -IVS-I-1 (G→A).

A mutação β -IVSI-1 (G→A) é uma mutação β° -tal porque altera os nucleótidos conservados (GT) do local *donor splice*, eliminando completamente o *splicing* do RNA neste local. Durante o normal processamento do mRNA as sequências intrónicas dos genes globínicos, transcritas em mRNA precursor, são excisadas e os terminais das sequências codificantes são unidos. Este processo requer sequências nucleotídicas específicas nas junções entre os exões e os intrões, os dinucleótidos GT no terminal 5' e AG no terminal 3' dos intrões, assim como as sequências consenso envolventes. A sequência consenso 5' ou local *donor splice* inclui os últimos 3 nucleótidos do exão e os primeiros 6 nucleótidos do intrão, enquanto que o local 3' ou *acceptor splice* inclui os 10 últimos nucleótidos do intrão e o primeiro nucleótido do exão [9]. A alteração (G→A) no IVS-I-1 é uma das mutações mais comuns na área Mediterrânica, com uma prevalência de 14,7 % na Região Centro de Portugal [70].

Com o objectivo de explicar o valor de Hb A₂ inferior ao que era esperado numa beta talassemia *minor*, procedeu-se ao estudo do gene delta globínico. Foi identificada a deleção delta Corfu em heterozigotia, com os *breakpoints* 5' na região intergénica $\beta\psi$ - δ , a -5896 nt do *Cap Site* do gene δ (coordenada 46640 - NCIB UO1317) e 3' no final do IVS-II do gene δ -globínico, a +820 nt (coordenada 53851 - NCIB UO1317), deixando intacto apenas o exão III do gene δ .

A deleção Corfu de 7,2 Kb, denominada deleção δ° -tal porque silencia o gene δ -globínico, foi anteriormente identificada em várias famílias Italianas e Turcas, em heterozigotia simples ou dupla, *in cis* com a mutação β^+ -IVSI-5 (G→A) ou com a mutação β° -CD39 (C→T) [94, 96-98]. Neste indivíduo a deleção Corfu encontra-se *in trans* com a mutação β -IVSI-1, uma vez que o seu filho apresenta apenas a mutação β -IVS-I-1. Os

breakpoints da deleção são idênticos aos anteriormente descritos [94-95]. É a primeira vez que esta mutação é descrita num indivíduo português em associação com a mutação β -IVS-I-1 (G→A).

Este caso ilustra como a co-herança de um alelo δ - e β -tal *in cis* ou *in trans*, resulta num fenótipo de hipocromia e microcitose com valores de Hb A₂ normais ou ligeiramente diminuídos, podendo ser incorrectamente confundido com uma α -tal. É particularmente importante o diagnóstico a nível molecular destes casos quando for necessário proceder a aconselhamento genético de casais de portadores de hemoglobinopatias.

Caso B

Indivíduo do sexo masculino com hipocromia/microcitose (VGM 76 fL, HGM 21 pg) e Hb A₂ 2,6% (11-B das Tabelas III.3 e III.4), cuja mãe apresentava parâmetros hematológicos normais e o pai tinha VGM 81 fL, HGM 24 pg e Hb A₂ 2,6% (19-B das Tabelas III.3 e III.4). A sequenciação dos genes alfa globínicos evidenciou, no propósito e no pai, heterozigotia para uma mutação no terceiro exão do gene α_2 , codão 125 (CTG→CGG). Esta alteração nucleotídica leva à codificação do aminoácido arginina em vez da leucina 125, à síntese de uma cadeia α -globínica anormal e consequente formação de uma variante α de hemoglobina. O aminoácido 125 está situado na região da hélice H da cadeia α -globínica, um local crítico para o contacto das cadeias α - β [151]. A alteração de leucina por arginina impede a formação do dímero $\alpha\beta$ e consequentemente formação do tetrâmero, originando um fenótipo de α^+ -tal por um mecanismo pós-translacional [151]. A Hb Quong Sze, comum na população Chinesa, é uma outra variante de Hb devida a uma mutação no aminoácido 125 do gene α_2 (leucina→ prolina), que o estado heterozigótico apresenta também um fenótipo de α -talassemia [151,161]. A Hb Quong Sze está descrita como uma variante de Hb altamente instável, em que as cadeias α livres são rapidamente catabolizadas, pelo que não é detectada por meios electroforéticos nem cromatográficos [151].

Esta variante foi recentemente identificada pela primeira vez num indivíduo de origem espanhola, tendo sido designada Hb Plasencia [210]. É a primeira vez que a Hb Plasencia é descrita na população Portuguesa.

Caso C

O propósito é um indivíduo do sexo masculino designado 22-C (Tabelas III.3 e III.4) com VGM 76 fL, HGM 24 pg, Hb A₂ 2,7%, no qual foi identificada uma mutação em heterozigotia no gene α_2 , que consiste na deleção do primeiro nucleótido (-G) do segundo intrão do gene α_2 -globínico [(-G) IVS-II-1] dando origem a uma *frameshift*. A sequência original AAGgtgagcgg é alterada para AAGtgagcgg, o que muda a sequência de *splicing* crítica (GT) a 5' do intrão, anulando o *splicing* no transcrito de RNA nessa posição e levando provavelmente à produção de um mRNA mais longo (com mais 128 nucleótidos).

Embora esta mutação leve a uma diminuição na síntese de cadeias globínicas, ainda estão presentes outros três genes α -globínicos que continuam a sintetizar normalmente, pelo que seria de esperar um fenótipo semelhante ao observado, por exemplo, na deleção de 3,7 Kb ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$). A hipocromia/microcitose mais acentuada neste indivíduo (22-C) poderá ser devida ao facto de ser sintetizado um polipeptídeo longo (com mais 128 nucleótidos), incapaz de formar tetrâmeros, que vai sobrecarregar o sistema proteolítico da célula, o que não acontece quando há grandes deleções. Estas observações estão de acordo com o que tem sido descrito na literatura, a propósito dos alelos com mutações não deleccionais ($\alpha^T\alpha$) que se associam a fenótipos mais severos do que os alelos α com deleções [37].

A mutação α_2 -IVS-II-1 (-G) foi identificada aqui pela primeira vez e não há descrição anterior de deleções de um só nucleótido nos genes α -globínicos. Foram descritas seis mutações pontuais que afectam o processamento do mRNA dos genes α : 3 no local *poly A* do gene α_2 [134-137]; uma deleção de 5 nt no local 5' *donor* do IVS-I do gene α_2 ($\alpha^{\text{Hph}}\alpha$) [134], uma no local de *acceptor splice* do IVS-I do gene α_1 [IVS-I-117 (G→A)] [133] e outra no local de consenso *donor splice* α_1 IVS-I-1 (G→A), em combinação com α^{SEA} ($-\alpha^{\text{SEA}}$), numa família tailandesa com doença da Hb H [139].

Caso D

Indivíduo do sexo masculino com hipocromia/microcitose (VGM 69 fL, HGM 22 pg) (indivíduo 12-D da Tabela III.3 e III.4), cujos estudos familiares revelaram ligeira hipocromia e microcitose na mãe (VGM 80 fL, HGM 26 pg) e no irmão (VGM 77 fL, HGM 24 pg) (32-D e 21-D Tabela III.2 e III.4). Não foi possível estudar o pai; não é conhecida consanguinidade.

A sequenciação dos genes α -globínicos evidenciou uma mutação no segundo exão do gene α_1 , não descrita anteriormente. A mutação consiste numa pequena deleção/inserção: foram deleccionados 9 pb (codões 82-84) e substituídos por 5 nucleótidos distintos. A mutação está presente em homozigotia no propósito e em heterozigotia na mãe e no irmão. A mutação origina um codão stop no local de *splice donor*, pelo que será necessário realizar estudos de expressão de modo a perceber se a mutação originará um peptídeo mais curto (com menos 43 aminoácidos) ou se há eliminação do local de splicing e não há formação de cadeia.

O mapeamento genético por *Southern Blotting* mostrou a presença do polimorfismo *Bgl* II, em homozigotia no propósito e em heterozigotia na mãe; os dados do irmão não são conclusivos. O estudo das regiões hipervariáveis 5'UTR e 3'UTR revelou que o propósito apresenta apenas um alelo na região 5'HVR, de $\approx 1,0$ Kb, que corresponde a um único fragmento, o mesmo acontecendo na região 3'HVR, com um fragmento de 1,8 Kb. A amostra da mãe apresenta dois alelos na região 5'HVR, de 0,9 e 1,0 Kb e dois na 3'HVR, de 1,8 e 2,6 Kb (Fig. III.10). O propósito apresenta apenas fragmentos correspondentes aos alelos herdados da mãe, sendo pouco provável que tenha herdado do pai alelos do mesmo tamanho, uma vez que não é conhecida consanguinidade. A interpretação destes resultados sugere a ocorrência de uma grande deleção, herdada ou *de novo*, no alelo de origem paterna. Essa deleção poderia explicar que a mutação identificada no gene α_1 apareça com um padrão de homozigotia na sequenciação.

O estudo numa amostra de sangue do pai do propósito poderia clarificar primeiramente se ele também tem o polimorfismo *Bgl* II. Em caso negativo poder-se-ia inferir com maior segurança a presença de uma grande deleção no cromossoma de origem paterna. Em caso positivo ajudaria a delimitar a deleção, que teria que ser caracterizada com estudos adicionais de mapeamento genético do *cluster* de genes α , hibridação *in situ*

e/ou electroforese em campo pulsado. A hipótese do propósito possuir a mutação deleção/inserção em homozigotia é pouco provável por se tratar de uma mutação rara e aparentemente não haver consanguinidade.

A deleção/inserção encontrada no gene globínico α_1 é uma mutação talassémica, responsável pela ligeira hipocromia e microcitose na mãe e irmão do propósito. Seria interessante fazer estudos de quantificação do mRNA, de modo a calcular o déficit na expressão do gene α_1 mutado.

Esta mutação não estava descrita até ao momento e este tipo de deleção/inserção nos genes α -globínicos só foi reportado uma vez, no gene α_2 [166]. Mutações no gene α_1 , incluindo a que é descrita presentemente, são de particular interesse porque este gene está descrito como sendo responsável pela produção de apenas um quarto das cadeias α -globínicas [36]. Os fenótipos associados a esta mutação no gene α_1 ($\alpha\alpha^T$) e à mutação no gene α_2 ($\alpha^T\alpha$) identificada no Caso C, são semelhantes, o que está de acordo com estudos mais recentes que indicam que os dois genes α_2 e α_1 sintetizam um número semelhante de cadeias, porque o primeiro tem uma transcrição mais eficiente, mas o segundo tem maior eficiência na tradução [35-36].

Em resumo: trata-se de uma família Portuguesa em que foi identificada uma nova mutação talassémica do tipo deleção/inserção no gene α_1 ($\alpha\alpha^T$). É provável que o propósito tenha, *in trans*, uma grande deleção, a caracterizar em estudos complementares posteriores.

Caso E

Foi estudada uma amostra de um indivíduo de 35 anos de idade (16-E; Tabelas III.3 e III.4), de origem espanhola, para aconselhamento genético, por a esposa ter uma $\delta\beta$ -talassemia devida a uma heterozigotia para a deleção $\delta\beta$ -Spanish. O indivíduo apresentava esplenomegalia e uma anemia ligeira, hipocrómica e microcítica, diagnosticada há mais de 20 anos, sem resposta ao ferro oral ou intravenoso (ferritina 260

ng). Os pais, não consanguíneos, têm parâmetros hematológicos normais, assim como os irmãos (Tabelas III.4).

A pesquisa das deleções alfa mais frequentes, de mutações alfa não-delecionais, o mapeamento genético do *cluster* alfa e a sequenciação dos genes beta e delta globínicos não evidenciaram quaisquer mutações. A análise do haplótipo do gene beta globínico não sugeriu a presença de grandes deleções. O rácio de cadeias $\alpha/\beta = 0.83$, embora seja apenas ligeiramente inferior ao normal, poderá indicar uma ligeira redução na síntese das cadeias alfa ou a associação de α e β talassemia.

De modo a clarificar a origem deste quadro clínico deverão ser feitos outros estudos moleculares, como a pesquisa de mutações nas regiões de controlo da expressão dos genes α e β (HS-40 e LCR) e nos genes das proteínas envolvidas na transcrição do gene.

A expressão dos genes α -globínicos é dependente do elemento regulatório HS-40 [41]. Este elemento situa-se numa região de cromatina aberta e contém locais de ligação para uma variedade de factores *trans-acting* eritróides (GATA-1 e NF-E2) [42-43] e ubíquos [25, 44].

Cada um dos locais da região de controlo do gene beta, LCR (HS 1-5), também possui sequências de ligação para factores *trans-acting* eritróides e ubíquos [24-26], que actuam de modo cooperativo. O LCR parece afectar a organização cromatínica do *cluster* de genes β -globínico [27] e regular a transcrição sequencial individual de cada gene durante a ontogénese [28]. A activação do LCR, um processo que tem várias etapas [29], desempenha um papel crítico na expressão do gene β -globínico ao manter a cromatina num estado aberto e actuando como um forte activador na transcrição do gene. Na ausência do LCR o nível de expressão dos genes β -globínicos é baixo.

Uma outra hipótese a considerar é a ocorrência de mutações no gene transportador de metais divalente, DMT1, uma proteína crucial para a absorção duodenal e transporte eritróide do ferro [173].

A primeira mutação humana no gene *DMT1*, Glu→Asp na posição 1285, foi descrita recentemente num indivíduo com anemia hipocrómica e microcítica com excesso de ferro, em que, após exclusão de talassemia foi sugerida uma deficiência no transporte e utilização de ferro nas células eritróides, por provável diminuição da expressão do gene *DMT1*. Os níveis elevados de ferro serão devidos a uma elevada absorção do ferro derivado do heme, em resposta à anemia. [182-183]. Neste Caso E o propósito poderá ser

portador de alguma mutação no gene DMT1, o que poderia justificar a anemia hipocrômica e microcítica.

A análise dos resultados e das hipóteses diagnósticas neste indivíduo, embora não tenham permitido determinar a etiologia da hipocromia e microcitose, não sugerem risco de este casal ter descendência com um fenótipo grave de talassemia.

2. Discussão das restantes amostras do Grupo II

Dos 14 indivíduos referidos em que não foram detectadas mutações foi já discutido um deles, o 16-E, referido como Caso E; nos outros 13 indivíduos do Grupo II (1-4, 6-10, 14, 17, 21 e 23 da Tabela III.3) que não apresentaram mutações pelos métodos descritos anteriormente, foi realizado o mapeamento genético α -globínico por *Southern blot*. A região HS-40 está presente em todas as amostras e não apresenta qualquer deleção. Os resultados obtidos por hibridação *Alu* I - 5'HVR - e *Hinf* I - 3'HVR mostraram que a maioria das amostras (excepto os indivíduos 14 e 23) apresenta alelos de tamanhos diferentes, nas regiões flangeadoras do *cluster* α -globínico, 5' HVR e 3' HVR (ou seja, apresentam dois fragmentos em cada região HVR), o que exclui a possibilidade de grandes deleções removendo os genes α - e ζ -globínicos nessas amostras.

A pesquisa de mutações pontuais nos genes α - e β -globínicos nestes 13 indivíduos não evidenciou qualquer mutação, apenas alguns polimorfismos comuns.

O indivíduo 14 (Tabela III.3) apresentou um único fragmento para a região 5' HVR e dois fragmentos para a região 3' HVR; esta observação poderá ser indicativa de alguma grande deleção na extremidade 5' HVR do *cluster*, mas seria muito útil estudar os pais para verificar se ambos têm uma das regiões hipervariáveis flangeadoras com as mesmas dimensões, o que é pouco comum. Se isso não acontecer, é de considerar a existência de uma grande deleção e prosseguir os estudos, nomeadamente por hibridação e se necessário hibridação *in situ*.

O indivíduo 23 (Tabela III.3) apresenta apenas um fragmento para cada uma das regiões 5' e 3' HVR e é de suspeitar de uma grande deleção, dado que, apesar da acentuada

hipocromia e microcitose, não foram detectadas mutações pontuais nos genes α - e β -globínicos. O estudo dos pais seria útil para orientar as investigações.

Nos indivíduos em que o estudo realizado não indicou a presença de talassemia poderão ser feitos estudos complementares (semelhantes aos sugeridos anteriormente na discussão do Caso E), nomeadamente a pesquisa de mutações nos elementos de regulação da expressão HS-40 e/ou LCR, nos factores *trans-acting* eritróides, ou nas proteínas nucleares que se ligam às sequências regulatórias, afectando o processo de activação das sequências reguladoras da expressão globínica. A presença de uma mutação no gene *DMT1* que afecte a absorção e utilização do ferro, provocando uma anemia hipocrómica e microcítica é uma hipótese a investigar.

Concluindo: O estudo molecular efectuado num grupo de 57 indivíduos com hipocromia/microcitose hereditária, doseamento de Hb A₂ normal e sem alterações no perfil ou na focagem isoeléctrica das Hbs, permitiu identificar algumas mutações talassémicas raras, duas delas identificadas pela primeira vez em Portugal e outras duas não descritas anteriormente.

Os 34 indivíduos do Grupo I (com parâmetros hematológicos pouco inferiores) apresentaram sobretudo as deleções $\alpha^{3.7}$ e $\alpha^{4.2}$ de acordo com o esperado; dois indivíduos (mãe e filho) eram portadores de uma mutação não deleccional no gene α_1 não descrita anteriormente. Em 20 das 34 amostras não foram detectadas mutações talassémicas, o aprofundamento do estudo molecular neste tipo de amostras é obrigatório nos casos de aconselhamento genético se os dois elementos de um casal têm hipocromia/microcitose, mas nos outros casos será dispensável, uma vez que na maioria não serão encontradas quaisquer mutações talassémicas.

Nos 23 indivíduos do Grupo II foi possível identificar duas mutações nunca antes identificadas: uma mutação pontual no gene α_2 -globínico (IVS-II-1 (-G)), e uma deleção/inserção no gene α_1 . Foram ainda encontradas duas outras mutações não descritas na população portuguesa: a deleção Corfu associada *in trans* a uma mutação β -IVS-I-1

(G→A) e uma variante talassémica de Hb (Hb Plasencia), identificada recentemente, pela primeira vez, num indivíduo espanhol.

Com a amostra estudada não é possível concluir da prevalência destas mutações talassémicas menos comuns na população Portuguesa e falta ainda determinar as alterações moleculares responsáveis pelos parâmetros observados em alguns dos indivíduos, no entanto, a pesquisa destas novas mutações por técnicas de PCR, sequenciação e digestão enzimática, pode ser incluída na rotina deste tipo de investigações.

V – Referências Bibliográficas

V – Referências Bibliográficas

1. Liebhaber, S.A. (1989). α Thalassemia. Hemoglobin, **13**:685.
2. Higgs, D.R. (1993). α -Thalassemia. In The Haemoglobinopathies. Weatherall, D.J. e Higgs, D.R. (Eds). Bailliere's Clinical Haematology, vol.6, p. 117, W.B. Saunders Company. London.
3. Weatherall, D.J. e Clegg, J.B. (2001). The Thalassaemia Syndromes. 4th Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
4. Weatherall, D.J. e Clegg, J.B. (2001). Inherited hemoglobin disorders: an increasing global health problem. Bulletin of the World Health Organization. **8**:704.
5. Nienhuis, A.W., Anagnou, N.P., e Ley, T. J. (1984). Advances in Thalassemia Research. Blood, **63**:738.
6. Efremov, G.D. (1992). Overview of hemoglobin variants in the Mediterranean Basin. In Current views on Thalassaemia with special reference to its Mediterranean presence. Roath, S. e Huisman, T.H.J. (Eds), p. 43. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
7. Martins, M.C., Olim, G., Melo, J., Magalhães, H.A. e Rodrigues, M.O. (1993). Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance and control. J. Med. Genet., **30**:235.
8. GEHBTA (Baiget, M.). (1986). Los síndromes talasémicos en España. Datos epidemiológicos preliminares. Sangre, **31**:609.
9. Bunn, H.F. e Forget, B.G. (1986). Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
10. Zeng, Y-T e Huang, S-Z. (1987). Disorders of haemoglobin in China. J. Med. Genet. **24**:578.
11. Beutler, E. (1995). The sickle cell diseases and related disorders. In William's Hematology. 5th Ed. Beutler, M.A., Lichtman, B.S.C. e Kipps, T.J. (Eds), p. 116. International edition, McGraw-Hill, Inc., Health Profession Division, New York.
12. Wasi, P. (1986). Geographic distribution of hemoglobin variants in Southeast Asia. In Hemoglobin variants in human populations. Winter, W.P. (Ed), vol.2, p.111-127. Florida: CRC Press Inc.
13. Haldane, J.B.S. (1949). The rate of mutation of human genes. Hereditas, **35**:267 (suppl).
14. Bernini, L.F. e Hartevelde, C.L. (1998). α -Thalassemia. In Clinical Haematology: sickle cell disease and thalassaemia. Rodgers, G.P. (Ed). Bailliere's Clinical Haematology, vol.11, p. 53, W.B. Saunders Company. London.
15. Luzzi, G.A., Merry, H.A., Newbold, C.I., Marsh, K. e Pasvol, G. (1991). Protection by α -thalassemia against *Plasmodium falciparum* malaria: Modified surface antigen expression rather than impaired growth or cytoadherence. Immunol. Lett., **30**:233.
16. Luzzarato, L. (1985). Malaria and the red cell. In Recent Advances in Haematology. Hoffbrand, A.V. (Ed), p. 109. Churchill Livingstone, Edinburgh.
17. Friedman, M.J., Roth, E.F., Nagel, R.L. e Trager, W. (1979). *Plasmodium falciparum*: physiological interactions with the human sickle cell. Exp. Parasitol., **47**:73.

18. Huisman, T.H.J., Kutlar, F. e Gu, L-H. (1991). γ Chain abnormalities and γ -globin gene rearrangements in newborn babies of various populations. *Hemoglobin* **15**:349.
19. Gilman, J.G. e Huisman, T.H.J. (1985). DNA sequence variation associated with elevated fetal G_γ production. *Blood*, **66**:783.
20. Huisman, H.J. (1993). The structure and function of normal and abnormal haemoglobins. *In* The Haemoglobinopathies. Weatherall, D.J. e Higgs, D.R. (Eds). *Bailliere's Clinical Haematology*, vol.6, p. 1, W.B. Saunders Company. London.
21. Weatherall, D.J. (1991). *The New Genetics and Clinical Practice*. 3rd Ed. Oxford University Press, Oxford.
22. Weatherall, D.J. (2001). Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat. Rev. Gen.*, **3**: 245.
23. Huisman, H.J. (1993). The structure and function of normal and abnormal haemoglobins. *In* The Haemoglobinopathies. Weatherall, D.J. e Higgs, D.R. (Eds). *Bailliere's Clinical Haematology*, vol.6, p. 1, W.B. Saunders Company. London.
24. Philipsen, S., Talbot, D., Fraser, P. e Grosveld, F. (1990). The β -globin dominant control region: hypersensitive site 2. *EMBO J.*, **9**:21599.
25. Talbot, D., Philipsen, S. Fraser, P. e Grosveld, F. (1990). Detailed analysis of the site 3 region of the human β -globin dominant control region. *EMBO J.*, **99**:2169.
26. Pruzina, S., Hanscombe, O., Whyatt, D., Grosveld, F. e Philipsen, S. (1990). Hypersensitive site 4 of the human β -globin locus control region. *Nucleic Acids Res.*, **19**:1413.
27. Forrester, W.C., Epner, E., Driscoll, M.C., Enver, T., Brice, M., Papayannopoulou, Th. e Groudine, M. (1990). A deletion of the human β -globin activating region causes a major alteration in chromatin structure and replication across the entire β -globin locus. *Genes Develop.*, **4**:1637.
28. Fraser, P., Pruzina, S., Antoniou, M. e Grosveld, F. (1993). Each hypersensitive site of the human β globin locus control region confers a different developmental pattern of expression to the globin genes. *Genes Develop.*, **7**:106.
29. Vassilopoulos, G., Navas, P., Skarpidi, E., Peterson, K., Lowrey, C., Papayannopolou, T. e Stamatoyannopoulos. (1999). Correct function of the locus region may require passage through a nonerythroid cellular environment. *Blood*, **93**:703.
30. Thein, S.L. (2004). Genetic insights into the clinical diversity of β -thalassaemia. *Br. J. Heamat.*, **124**:264.
31. Michelson, A.M. e Orkin, S.H. (1983). Boundaries of gene conversion within the duplicated human α -globin genes. Concerted evolution by segmental recombination. *J. Biol. Chem.*, **258**:15245.
32. Liebhaber, S.A., Goossens M. e Kan, Y.W. (1981). Homology and concerted evolution of at the α_1 and α_2 loci of human α -globin. *Nature*, **290**:26.
33. Molchanova, T.P. e Huisman, T.H.J. (1996). The importance of the 3' untranslated region for the expression of the α -globin genes. *Hemoglobin*, **20**:41.

34. Liebhaber, S.A., Cash, F.E. e Ballas, S.K. (1986). Human α -globin gene expression. The dominant role of the α_2 -locus in mRNA and protein synthesis. *J. Biol. Chem.*, **261**:15327.
35. Molchanova, T.P., Pobedimskaya, D.D. e Huisman, T.H.J. (1994). The differences in quantities of α_2 - and α_1 -globin gene variants in heterozygotes. *Br. J. Haematol.*, **88**:300.
36. Higgs, D.R. (2001). Molecular mechanisms of α thalassemia. *In* Steinberg, M.H. (Ed.). Disorders of hemoglobin. p.405-430. Cambridge University Press. Cambridge.
37. Higgs, D.R. (1993). α -Thalassemia. *In* The Haemoglobinopathies. Weatherall, D.J. e Higgs, D.R. (Eds). *Bailliere's Clinical Haematology*, vol.6, p. 117, W.B. Saunders Company. London.
38. Jarman, A.P., Nicholls, R.D., Weatherall, D.J., Clegg, J.B. e Higgs, D.R. (1986). Molecular characterization of a hypervariable region downstream of the human α -globin gene cluster. *EMBO J.*, **5**:1857.
39. Jarman, A.P. e Higgs, D.R. (1988). A new hypervariable marker for the human α -globin gene cluster. *Am. J. Hum. Genet.*, **42**:8.
40. Royle, N.J., Clarkson, R.E., Wong, Z. e Jeffreys, A.J. (1988). Clustering a variable minisatellites in the proterminal regions of human autosomes. *Genomics*, **3**:352.
41. Higgs, DR., Wood, W.G., Jarman, A.P., Sharpe, J., Lida, J., Pretorius, I.M. e Ayyub, H. (1990). A major positive regulatory region located far upstream of the α -globin gene locus. *Genes Develop.*, **4**:1588.
42. Jarman, A.P., Wood, W.G., Sharpe, J.A., Gourdon, G., Ayyub, H. e Higgs, D.R. (1991). Characterization of the major regulatory element upstream of the α -globin gene cluster. *Mol. Cell Biol.*, **11**:4679.
43. Strauss, E.G., Andrews, N.C., Higgs, D.R. e Orkin, S.H. (1992). In vivo footprint of the human α -globin locus upstream regulatory element by guanine/adenine ligation-mediated PCR. *Mol. Cell Biol.*, **12**:2135.
44. Pruzina, S., Hanscomb, O., Whyatt, D., Grosveld, F. e Philipsen, S. (1991). Hypersensitive site 4 of the human β -globin locus control region. *Nucleic Acids Res.*, **19**:1413.
45. Viprakasit, V., Kidd, A., Ayyub, H., Horsley, S., Hughes, J. e Higgs, D. (2003). *De novo* deletion within the telomeric region flanking the human α globin locus as a cause of α thalassaemia. *Br. J. Haematol.*, **120**:867.
46. Weaver, R.F. (1999). *Molecular Biology*. WCB, MacGraw-Hill.
47. Efstratiadis, A., Posakony, J.W., Maniatis, T., Lawn, R.M., O'Connell, C., Spritz, R.A., deRiel, J.K., Forget, B.C., Weissman, S.M., Slightom, J.L., Blechl, A.E., Smithies, O., Baralle, F.E., Shoulders, C.C. e Proudfoot, N.J. (1980). The structure and evolution of the human β globin chain family. *Cell*, **21**:653.
48. Kosche, K.A., Dobkin, C. e Bank, A. (1985). DNA sequences regulating human β globin gene expression. *Nucleic Acids Res.*, **13**:7781.
49. Gruss, P. (1984). Review: Magic enhancers? *DNA*, **3**:1.

50. Stamatoyannopoulos, C. e Nienhuis, A.W. (1994). Hemoglobin switching. *In* The Molecular Basis of Blood Diseases. Stamatoyannopoulos, C., Nienhuis, A.W, Majerus, P. e Varmus, A. (Eds), p. 107, 2nd edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
51. Raich, N., Papayannopoulou, Th., Stamatoyannopoulos, C. e Enver, T. (1992). Demonstration of a human ϵ -globin gene silencer with studies in transgenic mice. *Blood*, **79**:861.
52. <http://globin.cse.psu.edu/globin>.
53. Hardison, R.C., Chui, D.H., Giardine, B., Riemer, C, Patrinos, G.P., Anagnou, N., Miller, W. e Wajcman H. (2002). Hb Var: a relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Hum. Mut.*, **19**: 225.
54. Huisman, T.H.J. (1990). Frequencies of common β -thalassaemia alleles among different populations: variability in clinical severity. *Br. J. Haematol.*, **75**:454.
55. Gonzalez-Redondo, J.M., Stoming, T.A., Lanclos, K.D., Gu, Y.C, Kutlar, A., Kutlar, F., Nakatsuji, T., Deng, B., Han, I.S., McKie, V.C. e Huisman, T.H.J. (1988). Clinical and genetic heterogeneity in Black patients with homozygous β -thalassemia from the Southeastern United States. *Blood*, **72**:1007.
56. Huang, S.Z., Wong, C., Antonarakis, S.E., Ro-lien, T., Lo, W.H.Y. e Kazazian, H.H., Jr. (1986). The same TATA box β -thalassemia mutation in Chinese and US Blacks: another example of independent origin of mutation. *Hum. Genet.*, **74**:162.
57. Codrington, J.F., Li, H-W., Kutlar, F., Cu, L-H., Ramachandran, M. e Huisman, T.H.J. (1990). Observations on the levels of Hb A₂ in patients with different β -thalassemia mutations and a chain variant. *Blood*, **76**:1246.
58. Faustino, P., Osorio-Almeida, L., Barbot, J., Espirito-Santo, D., Gonçalves, J., Romão, L., Martins, M.C., Marques, M.M. e Lavinha, J. (1992). Novel promoter and splice junction defects add to the genetic, clinical or geographic heterogeneity of β -thalassaemia in the Portuguese population. *Hum. Genet.*, **89**:573.
59. Bento, C., Almeida, H., Gonçalves, P., Feliciano, J., Ribeiro, M.L. e Tamagnoni, G. (1996). Talasemia Beta Intermedia en una Familia Portuguesa debido a Homozigotia para la mutation -90 (C→T). *Sangre*, **41**:12.
60. Gonzalez-Redondo, J.M., Stoming, T.A., Kutlar, A., Kutlar, F., Lanclos, K.D., Howard, E.F., Fei, Y.J., Aksoy, M., Altay, Ç., Gurgey, A., Basak, A.N., Efremov, C.D., Petkov, G. e Huisman, T.H.J. (1989). A C→T substitution at nt -101 in a conserved DNA sequence of the promoter region of the β -globin gene is associated with "silent" β -thalassemia. *Blood*, **73**:1705.
61. Baysal, E., Ribeiro, M.L. e Huisman, T.H.J. (1994). Binding of Nuclear Factors to the proximal and distal CACCC motifs of the β -globin gene promoter: implications for the -101 (T-C) "silent" beta-thalassemia mutations. *Acta Haematologica*, **91**:16.
62. Yu, G., Kaysen, J., Donovan-Peluso, M. e Bank, A. (1988). DNA binding factors upstream from the β -globin gene. *Abstract*, VI Conference on Hemoglobin Switching, Airlie, VA.

63. Maragoudaki, E., Kanavakis, E., Trager-Synodinos, J., Vrettou, C., Tzetis, M., Metxotou-Mavrommati, A. e Kattamis, C. (1999). Molecular, haematological and clinical studies of the -101 C →T substitution in the β-globin gene promotor in 25 β-thalassaemia intermedia patients and 45 heterozygotes. *Br. J. Haematol.*, **107**:699.
64. Wong, C., Dowling, C.E., Saiki, R.K., Higuchi, R.C., Erlich, H.A. e Kazazian, H.H., Jr. (1987). Characterization of beta-thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature*, **330**:384.
65. Treisman, R., Orkin, S.H. e Maniatis, T. (1983). Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned β-thalassaemia genes. *Nature*, **302**:591.
66. Antonarakis, S.E., Orkin, S.H., Cheng, T-C., Scott, A.F., Sexton, J.P., Trusko, S., Charache, S. e Kazazian, H.H., Jr. (1984). Beta thalassaemia in American blacks: novel mutations in the TATA box and an acceptor splice site. *Proc. Natl. Aced. Sci. USA*, **81**:1154.
67. Tamagnini, G.P., Lopes, M.C., Castanheira, M.E., Wainscoat, J.S. e Wood, W. C. (1983). Beta-plus-thalassaemia Portuguese type: clinical, haematological and molecular studies of a newly defined form of beta-thalassaemia. *Br. J. Haematol.*, **54**:189.
68. Tamagnini, G.P., Gonçalves, P., Ribeiro, M.L., Kaeda, J., Kutlar, F., Baysal, E. e Huisman, T.H.J. (1993). Beta-thalassaemia mutations in the Portuguese; high frequencies of two alleles in restricted populations. *Hemoglobin*, **17**:31.
69. Efremov, D.G., Dimovsky, A.J., Baysal, E., Adekile, A.D., Ribeiro, M.L., Schiliro, G., Altay, Ç., Gurgey, A., Efremov, G.D. e Huisman, T.H.J. (1994). Possible factors influencing the haemoglobin and fetal haemoglobin levels in patients with β-Thalassaemia due to homozygosity for the IVS-I-6 (T-C) mutation. *Brit. J. Haemat.*, **86**:824.
70. Ribeiro, M.L., Gonçalves, P., Cunha, E., Bento, C., Almeida, H., Pereira, J., Martín Núñez, G. e Tamagnini, G.P. (1997). Genetic heterogeneity of beta-thalassaemia in populations of the Iberian Peninsula. *Hemoglobin*, **21**:261.
71. Ribeiro, M.L., Baysal, E., Kutlar, F., Tamagnini, G.P., Gonçalves, P., Lopes, D. e Huisman, T.H. (1992). A novel beta zero-thalassaemia mutation (codon 15 TGG-TGA) is prevalent in a population of Central Portugal. *Brit. J. Haemat.*, **80**:567.
72. Ohba, Y., Harano, T., Harano, K., Fukumaki, Y., e Ideguchi, H. (1997). β-Thalassaemia mutations in Japanese Koreans. *Hemoglobin*, **21**:191.
73. Saba, L., Meloni, A., Sardu, R., Travi, M., Primignani, P., Rosatelli, M.C. e Gao, A. (1992). A novel beta-thalassaemia mutation (G→A) at the initiation codon of the β-globin gene. *Hum. Mutat.*, **1**:420.
74. Öner, R., Agarwal, S., Dimovski, A.J., Efremov, G.D., Petkov, C.H., Altay, Ç., Gurgey, A. e Huisman, T.H.J. (1991). The C→A mutation at position +22 3' to the Cap site of the β-globin gene as a possible cause for a β-thalassaemia. *Hemoglobin*, **15**:67.
75. Bento, M.C., Ribeiro, M.L., Cunha, E., Gonçalves, P., Martín-Nuñez, G. e Tamagnini, G. (2000). β-thalassaemia intermedia resulting from compound heterozygosity for an IVS-I-1 (G-A) and a silent 5' UTR +33 (C-G) mutations *Haematologica*, **85**:443.

76. De Angioletti, M., Lacerra, G., Sabato, V. e Carestia, C. (2004). $\beta+45$ G \rightarrow C: a novel silent β -thalassaemia mutation, the first in the Kozak sequence. *Br. J. Haematol.*, **124**:224.
77. Rund, D., Dowling, C., Najjar, K., Rachmilewitz, E.A., Kazazian, H.H., Jr. e Oppenheim, A. (1992). Two mutations in the β -globin polyadenylation signal reveal extended transcripts and new RNA polyadenylation sites. *Proc. Natl. Aced. Sci. USA*, **89**:4324.
78. Mitchell, P. e Tollervey, D. (2000). mRNA stability in eucaryotes. *Cur. Op. Gen. Dev.*, **10**: 193.
79. Sgourou, A., Papachatzopoulou, A., Psiouri, L. Antoniou, M., Zoumbos, N., Gibbs, R. e Athanassiadou, A. (2002). The β -globin C \rightarrow G mutation at 6 bp 3' to the termination codon causes β -thalassaemia by decreasing the mRNA level. *Br. J. Haematol.*, **118**:671.
80. Thein, S.L. (1993). β -Thalassaemia. *In* The Haemoglobinopathies. Weatherall, D.J. e Higgs, D.R. (Eds). *Bailiere's Clinical Haematology*, vol.6, p. 151, W.B. Saunders Company. London.
81. Smetanina, N.S., Gu, L.H., Simjanovska, L., Momirovska, A., Petkov, G.H., Adekile, A.D., Efremov, G.D. e Huisman, T.H.J. (1997). α -, β -, and γ -mRNA levels in β -thalassemia; transcriptional and translational differences in heterozygotes, homozygotes, and compound heterozygotes. *Hemoglobin*, **21**:27.
82. Indrak, K., Brabec, V., Indrakova, J., Chrobak, L., Sakalova, A., Jarosova, M., Cermak, J., Fei, Y-J., Kutlar, F., Gu, Y-C., Baysal, E. e Huisman, T.H.J. (1992). Molecular characterization of β -thalassemia in Czechoslovakia. *Hum. Genet.*, **88**:399.
83. Yamamoto, Ku., Yamamoto, Ki., Hattori, Y., Yamashiro, Y., Hoshitani, M., Morishita, M., Ohba, Y., Katahira, H., Karasawa, M., Omine, M., Narukiyo, T., Hirabayashi, K. e Miyawaki, S. (1992). Two β -thalassemia mutations in Japan: codon 121 (GAA \rightarrow TAA) and IVS-1-130 (G \rightarrow C). *Hemoglobin*, **16**:295.
84. Hussein, I.R., Temtamy, S.A. e El-Beshlawy. (1993). Molecular characterization of β -thalassemia in Egiptyans. *Hum. Mutat.*, **2**:48.
85. Divoky, V., Gu, L-H., Indrak, K., Mocikova, K., Zarnovicanova, M. e Huisman, T.H.J. (1993). A new β^0 -Thalassemia nonsense mutation (codon 112 T \rightarrow A) not associated with a dominant type of thalassemia in the heterozygote. *Brit. J. Heamtol.*, **83**:523.
86. Oner, R., Oner, C., Wilson, J.B., Tamagnini, G.P., Ribeiro, M.L., Huisman, T.H.J. (1991). Dominant β -thalassemia trait in a portuguese family is caused by a deletion of (G)TGGCTGGTGT(G) and an insertion of (G)GCAG(G) in codons 134, 135, 136 and 137 of the beta-globin gene. *Br. J. Haemat.*, **79**:306.
87. Thein, S.L., Old, J.M., Wainscoat, J.S. e Weatherall, D.J. (1984). Population and genetic studies suggest a single origin for the Indian deletion β^0 thalassemia. *Br. J. Haematol*, **57**:271.
88. Dimovski, A.J., Efremov, D.G., Jankovic, L., Plaseska, D., Juricic, D. e Efremov, G.D. (1993). A β^0 -thalassaemia due to a 1605 bp deletion of the 5' β -globin gene region. *Br. J. Haematol.*, **85**:143.
89. Boehringer, R.R., Ryan, T.M., Palmiter, R.D., Brinster, R.L. e Townes, T.M. (1990). Human γ to β globin gene switching in transgenic mice. *Genes Develop.*, **4**:380.

90. Dimovski, A.J., Divoky, V., Adekile, A.D., Baysal, E., Wilson, J.B., Prior, J.F., Raven, J.L. e Huisman, T.H.J. (1994). A novel deletion of ≈ 27 kb including the β - globin gene and the locus control region 3'HS-1 regulatory sequence: β^0 -thalassemia or hereditary persistence of fetal hemoglobin? *Blood*, **83**:822.
91. Badens, C., Mattei, M.G., Imbert, A.M., Lapoumérouliee, C., Martini, N., Michel, G. e Lena-Russo, D. (2002). A novel mechanism for thalassaemia intermédia. *The Lancet*, **359**:132.
92. Tzetis, M., Traeger-Synodinos, J., Kanavakis, E., Metaxotou-Mavromati, A. e Kattamis, C. (1994). The molecular basis of normal Hb A₂ (type 2) δ -thalassemia in Greece. *Hematol. Pathol.*, **8**:25.
93. Loudianos, G., Cao, A., Ristaldi, M.S., Pirastu, M., Tzetis, M., Kanavakis, E. e Kattamis, C. (1990). Molecular basis of $\delta\beta$ -thalassemia with normal fetal hemoglobin level. *Blood*, **75**:526.
94. Galanello, R., Melis, M.A., Podda, A., Monne, M., Perseu, L., Loudianos, G., Cao, A., Pirastu, M. e Piga, A. (1990). Deletion δ -thalassemia: the 7.2 Kb deletion of Corfu $\delta\beta$ thalassemia in a non- β -thalassemia chromosome. *Blood*, **75**:1747.
95. Waiscoat, J.S., Thein, S.L., Wood, W.G., Weatherall, D.J., Metaxotou-Mavromati, A., Trots, S., Kanavakis, E. e Kattamis, C. (1988). A novel deletion in the β -globin gene complex. *Ann. NY. Acad. Sci.*; **445**: 20.
96. De Angioletti, M., Lacerra, G., Gaudio, C., Mastrodonato, G., Pagano, L., Mastrullo, L., Masciandaro, S. e Carestia, C. (2002). Epidemiology of the delta globin alleles in Southern Italy shows complex molecular, genetic, and phenotypic features. *Human Mutation*, **20**:358.
97. Ribeiro, M.L., Gu, L.H., Buchanan-Adair, I. e Huisman, T.J. (1993). Incorrect genetic counseling of a couple with β -thalassemia, due to incomplete testing. *Am. J. Hum. Genet.*, **52**:842.
98. Oner, R., Birben, E., Acar, C., Oner, C., Kara, A., Gumruk, F., Gurgey, A. E Altay, C. (2000). Molecular analysis of Turkish β -thalassemia heterozygotes with normal Hb A₂ levels. *Hemoglobin*, **24**:195.
99. Pressley, L., Higgs, D.R., Clegg, J.B. e Weatherall, D.J. (1980). Gene deletions in a thalassaemia prove that the 5' ζ -locus is functional. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**:3586.
100. Nicholls, R.D., Higgs, D.R., Clegg, J.B. e Weatherall, D.J. (1985). α^0 -Thalassaemia due to recombination between the $\alpha 1$ -globin gene and the *Alu* repeat. *Blood*, **65**:1434.
101. Gonzalez-Redondo J.M., Diaz-Chico, J.C., Malcorra-Azpiazu, J.J. Balda-Aguirre, M.I., Huisman, T.H.J. (1988). Characterization of a newly discovered α -thalassaemia-1 in two Spanish patients with Hb H disease. *Br. J. Haematol.*, **70**:459.
102. Villegas, A., Sanchez, J., Richard, P., Gonzalez F.A., Del Potro, E., Armada, B., Carreno, D.L. e Espinos, D. (1994). Characterization of a new ζ -thalassaemia-1 mutation in a Spanish family. *Hemoglobin*, **18**:29.
103. Villegas, A., Calero, F., Vickers, M.A., Ayyub, H. e Higgs, D.R. (1990). α -Thalassaemia in two Spanish families. *Eur. J. Haematol.*, **44**:109.
104. Gonzalez-Redondo J.M., Gilsanz, F. e Ricard, P. (1989). Characterization of a new α -thalassaemia-1 deletion in a Spanish family. *Hemoglobin*, **13**:103.

105. Fortina, P., Dianzani, I., Serra, A., Gottardi, E., Saglio, G., Farinasso, L., Piga, A., Gabutti, V. e Camaschella, C. (1991). A newly-characterized α -thalassaemia-1 deletion removes the entire α -like globin gene cluster in an Italian family. *Br. J. Haematol.*, **78**:529.
106. Viilegas, A., Sanchez, J., Gonzalez, F.A., Carreno, D.L. e Roper, P. (1994). α -Thalassemia-1 ($--^{CAL}$ mutation) in a Spanish family. *Am. J. Hematol.*, **46**:367.
107. Waye, J.S., Eng, B. E Chui, D.H.K. (1992). Identification of an extensive ζ - α globin deletion in a Chinese individual. *Br. J. Haematol.*, **80**:378.
108. Fei, Y.J., Liu, J.C., Walker, E.L.D., III e Huisman, T.H.J. (1992). A new gene deletion involving the $\alpha 2$ -, $\alpha 1$ - and $\theta 1$ -globin genes in a Black family with Hb H disease. *Am. J. Hematol.*, **39**:299.
109. Tang, W., Luo, H-Y, Albitar, M., Patterson, M., Eng, B., Waye, J., Liebhaber, S., Higgs, D. e Chui, D. (1992). Human embryonic ζ -globin chain expression in deletional α -thalassemias. *Blood*, **80**:517.
110. Hatton, C.S.R., Wilkie, A.O.M., Drysdale, H.C., Wood, W.G., Vickers, M.A., Sharpe, J., Ayyub, H., Pretorius, I.M., Buckle, V.J. e Higgs, D.R. (1990). Alpha-thalassemia caused by a large (62 kb) deletion upstream of the human alpha-globin gene cluster. *Blood*, **76**:221.
111. Wilkie, A.O.M., Lamb, J., Harris, P.C., Finney, R.D. e Higgs, D. (1990). A truncated human chromosome 16 associated with a thalassemia is stabilized by addition of telomeric repeat (TTAGGG)_n. *Nature*, **346**:868.
112. Liebhaber, S.A., Griese, E-U., Weiss, I., Cash, F.E., Ayyub, H., Higgs, D.R. e Horst, J. (1990). Inactivation of human α -globin gene expression by a *de novo* deletion located upstream of the α -globin gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **8**:9431.
113. Romão, L., Osorio-Almeida, L., Higgs, D.R., Lavinha, J. E Liebhaber, S.A. (1991). α -Thalassemia resulting from deletions of regulatory sequences far upstream of the α -globin structural gene. *Blood*, **78**:1589.
114. Romão, L., Cash, F., Weiss, I., Liebhaber, S., Pirastu, M., Galanello, R., Loi, A., Paglietti, E., Ioannou, P. e Cao, A. (1992). Human α -globin gene expression is silenced by terminal truncation of chromosome 16p beginning immediately 3' of the ζ -globin gene. *Hum. Genet.*, **89**:323.
115. Flint, J., Craddock, C., Villegas, A., Bentley, D., Williams, H., Galanello, R., Cao, A., Wood, W., Ayyub, H. e Higgs, D. (1994). Healing of broken human chromosomes by the addition of telomeric repeats. *Am. J. Hum. Gen.*, **55**: 505.
116. Flint, J., Rochette, J. Craddock, C., Dode, C., Vignes, B., Horsley, S., Kearney, L., Buckle, V., Ayyub, H. e Higgs, D. (1996). Chromosomal stabilisation by a subtelomeric rearrangement involving two closely related *Alu* elements. *Hum. Mol. Gen.*, **5**: 1163.
117. Sharpe, J., Summerhill, R., Vyas, P. Gourdon, G., Higgs, D. e Wood, W. (1993). The role of upstream DNase I Hypersensitive sites in the regulation of human α globin gene expression. *Blood*, **82**: 1666.
118. Wilkie, A.O., Buckle, V.J., Harris, P.C., Lamb, J., Barton, N.J., Reeders, S.T., Lidenbaum, R.H., Nicholls, R.D., Barrow, M., Bethlenfalvay, N.C., Hutz, H.M., Tolmie, J.L., Weatherall, D.J. e

- Higgs, D.R. (1990). Clinical features and molecular analysis of the α thalassemial mental retardation syndromes. Cases due to deletions involving chromosome band 16p13.3. *Am. J. Hum. Genet.*, **46**:1112.
119. Daniels, R., Peden, J., Lloud, C., Horsley, S., Clark, K., J., Tufarelli, Kearney, L. Buckle, V., Doggett, N. e Flint, J. (2001). Sequence, structure and pathology of the fully annotated terminal 2 Mb of the short arm of human chromosome 16. *Hum. Mol. Gen.*, **10**:339.
120. Horsley, S., Daniels, R., Anguita, E., Raynham, H., Peden, J., Villegas, A., Vickers, M., Green, S., Wayne, J. e Chui, D. (2001). Monosomy for the most telomeric, gene-rich region of human chromosome 16p causes minimal phenotypic effects. *Eur. J. Hum. Gen.*, **9**:217.
121. Higgs, D.R., Vickers, M.A., Wilkie, A.O.M., Pretorius, I-M., Jarman, A.P. e Weatherall, D.J. (1989). A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. *Blood*, **73**:1081.
122. Gu, Y.C., Landman, H. e Huisman, T.H.J. (1987). Two different quadruplicated α -globin gene arrangements. *Br. J. Haematol.*, **66**:245.
123. DeAngioletti, M., Lacerra, G., Castaldo, C., Cutolo, R., de Bonis, C., Buonanno, G. e Carestia, C. (1992). $\alpha\alpha\alpha\alpha^{\text{anti3.7type II}}$: a new α -globin gene rearrangement suggesting that the α -globin gene duplication could be caused by intrachromosomal recombination. *Hum. Genet.*, **89**:37.
124. Kulozik, A., Kar, B.C., Serjeant, B.E. e Weatherall, D.J. (1988). α -Thalassemia in India: its interaction with sickle cell disease. *Blood*, **71**:467.
125. Lacerra, G., Fioretti, G., De Angioletti, M., Pagano, L., Guarino, E., de Bonis, C., Viola, A., Maglione, G., Scarallo, A., De Rosa, L. e Carestia, C. (1991). $(\alpha)\alpha^{5.3}$: A novel α^+ -thalassemia deletion with the brekpoints in the $\alpha 2$ -globin gene and in close proximity to an Alu repeat between the $\psi\alpha 2$ - and $\psi\alpha 1$ -globin genes. *Blood*, **78**:2740.
126. Zhao, J-B., Zhao, L., Fei, Y-J., Liu, J-C. e Huisman, T.H.J. (1991). A novel α -thalassemia-2 (-2.7 kb) observed in a Chinese patient with Hb H disease. *Am. J. Hematol.*, **38**:248.
127. Harteveld, C., Van Delft, P., Wijermans, P., Kappers-Klunne, M., Weegenaar, J. Losekoot, M. e Giordano, P. (2003). A novel 7.9 deletion causing α^+ -thalassaemia in two independent families of Indian origin. *Br. J. Haematol.*, **120**:364.
128. Barbour, V., Tufarelli, C., Sharpe, J., Smith, Z., Ayyub, H., Heinlein, C., Sloane-Stanley, J., Indrak, K., Wood, W. e Higgs, D.R. (2000). α -Thalassaemia resulting from a negative chromosomal position effect. *Blood*, **96**:800.
129. Kattamis, C., Tzotzos, S., Kanavakis, E., Synodinos, J. e Metaxotou-Mavromati, A. (1988). Correlation of clinical phenotype to genotype in hemoglobin H disease. *The Lancet*, **i**:442.
130. Fucharoen, S., Winichagoon, P., Pootrakul, P., Piankijagum, A. e Wasi, P. (1988). Differences between two types of Hb H disease, α -thalassemia-1/ α -thalassemia-2 and α -thalassemia-1/Hb Constant Spring. *In: Birth Defects: Original Article Series*, p. 309, March of Dimes Birth Defects Foundation, USA.

131. Liang, R., Liang, S., Jiang, N.H., Wen, X-J., Zhao, J-B., Nechtman, J.F., Stoming, T.A. e Huisman, T.H.J. (1994). α - And β -thalassemia among Chinese children in Guangxi Province, P.R. China: molecular and hematological characteristics. *Br. J. Haematol.*, **86**:351.
132. Çürük, M.A., Dimovski, A.J., Baysal, E., Gu, L-H, Kutlar, F., Molchanova, T.P., Webber, B.B., Altay, Ç., Gurgey, A. e Huisman, T.H.J. (1993). Hb Adana or α_2^{59} (E8)Gly \rightarrow Asp β_2 , a severely unstable α 1-globin variant, observed in combination with the $-(\alpha)20.5$ kb α -thal-1 deletion in two Turkish patients. *Am. J. Hematol.*, **44**:270.
133. Çürük, M.A., Baysal, E., Gupta, R.B., Sharma, S. e Huisman, T.H.J. (1993). An IVS-I-117 (G \rightarrow A) acceptor splice site mutation in the α 1-globin gene is a nondeletional α -thalassemia-2 determinant in an Indian population. *Br. J. Haematol.*, **85**:148.
134. Higgs, D.R., Goodbourn, S.E.Y., Lamb, J., Clegg, J.B., Weatherall, D.J. e Proudfoot, N.J. (1983). α -Thalassemia caused by a polyadenylation signal mutation. *Nature*, **306**:398.
135. Thein, S.L., Hesketh, C. e Weatherall, D.J. (1988). The molecular basis of beta-thalassaemia in UK Asian indians: applications to prenatal diagnosis. *Br. J. Haematol.*, **70**:225.
136. Yuregir, G.T., Aksoy, K., Çürük, M.A., Dikrnen, N., Fei, Y-J., Baysal, E. e Huisman, T.H.J. (1992). Hb H disease in a Turkish family resulting from the interaction of a deletional α -thalassaemia-1 and a newly discovered poly A mutation. *Br. J. Haematol.*, **80**:527.
137. Hartevelt, C.L., Losekoot, M., Haak, H., Heister, G.A., Giordano, P.C. e Bernini, L.F. (1994). A novel polyadenylation signal mutation in the α_2 -globin gene causing α thalassaemia. *Br. J. Haematol.*, **87**:139.
138. Felbar, B.K, Orkin, S.H. e Hamer, D.H. (1982). Abnormal RNA splicing causes one form of α -thalassemia. *Cell*, **29**: 895.
139. Harteveld, C., Beijer, C., van Delft, P., Zanardini, R., Bernini, L. e Giordano, P. (2000). α -Thalassaemia as a result of a novel splice donor site mutation of the α_1 -globin gene. *Br. J. Haematol.*, **110**:694-398.
140. Pirastu, M., Saglio, G., Chang, J.C., Cao, A. e Kan, Y.W. (1984). Initiation codon as a cause of α -thalassemia. *J. Biol. Chem.*, **259**:123.
141. Olivieri, N.F., Chang, L.S., Poon, A.O., Michelson, A.M. e Orkin, S.H. (1987). An α -globin gene initiation codon mutation in a Black family with Hb H disease. *Blood*, **70**:729.
142. Moi, P., Cash, F.E., Liebhaber, S.A., Cao, A. e Pirastu, M. (1987). An initiation codon mutation (AUG-GUG) of the human α_1 -globin gene: structural characterization and evidence for a mild thalassemia phenotype. *J. Clin. Invest.*, **80**:1416.
143. Viprakasit V., Ayyub H. e May A. (2003). Dinucleotide deletion in $-\alpha^{3.7}$ allele causes a severe form of α^+ thalassaemia. *Eur. J. Haematol.*, **71**: 133.
144. Liebhaber, S.A., Coleman, M.B., Adams, J.G., Ill., Cash, F.E. e Steinberg, M.H. (1987). Molecular basis for nondeletion α -thalassemia in American blacks $\alpha^{216 \text{ GAG-UAG}}$. *J. Clin. Invest.*, **80**:154.
145. Safaya, S. e Rieder, R.F. (1988). Dysfunctional α -globin gene in hemoglobin H disease in blacks. *J. Biol. Chem.*, **263**:4328.

- 146.Clegg, J.B., Weatherall, D.J. e Milner, P.F. (1971). Hemoglobin Constant Spring - A chain termination mutant? *Nature*, **234**:337.
- 147.Clegg, J.B., Weatherall, D.J., Contopoulos-Griva, I., Caroutsos, K., Pongouras, P. e Tsevrenis, H. (1974). Hemoglobin Icaria, a new chain termination mutant which causes α -thalassemia. *Nature*, **251**:245.
- 148.Bradley, T.B., Wohl, R.C. e Smith, G.J. (1975). Elongation of the α -globin chain in a black family: interaction with Hb G Philadelphia. *Clin. Res.*, **23**:1314.
- 149.De Jong, W.W., Khan, P.M. e Bernini, L.F. (1975). Hemoglobin Koya Dora: high frequency of a chain termination mutant. *Am. J. Hum. Genet.*, **27**:81.
- 150.Waye, J.S., Eng, B., Patterson, M., Chui, D.H.K., Chang, L.S., Cogionis, B., Poon, A.O. e Olivieri, N.F. (1994). Hb E/Hb Lepore Hollandia in a family from Bangladesh. *Am. J. Hematol.*, **47**:262.
- 151.Goossens, M., Lee, K.Y., Lieghaber, S.A. e Kan, Y.W. (1982). Globin structural mutant $\alpha^{125\text{Leu-Pro}}$ is a novel cause of α -thalassemia. *Nature*, **296**:864.
- 152.Rochette, J., Barnetson, R., Thein, S.L., Varet, B. e Valensi, F. (1995). Hb Questembert is due to a base substitution (T→C) in codon 131 of the α_2 -globin gene and has an α thalassemia biosynthetic ratio. *Am. J. Hematol.*, **48**:289.
- 153.Viprakasit, V., Tanphaichitr, V., Veerakul, G., Chinchang, W., Petrarat, S., Pung-Amritt, P. e Higgs, D. (2004). Co-inheritance of Hb Pak Num Po, a novel $\alpha 1$ gene mutation, and α^0 thalassaemia associated with transfusion-dependent Hb H disease. *Am. J. Hem.*, **75**:157.
- 154.Gibbons, R.J., Brueton, L., Buckle, V.J., Burn, J., Clayton-Smith, J., Davison, B., Gardner, R., Homfray, T., Kearney, L., Kingston,H.M., Newbury-Ecob, R., Porteous, M., Wilkie, A., Higgs,D.R.. (1995). Clinical and hematologic aspects of the X-linked alpha-thalassemia/mental retardation syndrome (ATR-X). *Am. J. Med. Genet.*, **55**: 288.
- 155.Gibbons, R.J., Higgs, D.R.. (2000). Molecular-clinical spectrum of the ATR-X syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, **97**: 204.
- 156.Gibbons, R.J., Picketts, D.J., Villard, L., Higgs, D.R. (1995). Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with alpha-thalassemia (ATR-X syndrome). *Cell*, **80**: 837.
- 157.Garrick, D., Samara, V., McDowell, T., Smith, A., Dobbie, L., Higgs, D. e Gibbon, R. (2004). A conserved truncated isoform of the ATR-X syndrome protein lacking the SWI/SNF-homology domain. *Gene*, **326**: 23.
- 158.Bunn, H.F. (2003). Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N. Eng. J. Med.*, **337**: 762.
- 159.Bento, M.C., Ribeiro, M.L., Cunha, E., Rebelo, U., Granjo, E., Granado, C. e Tamagnini, G.P. (2000). Hb Vila Real [$\beta 36(\text{C}2)\text{Pro}\rightarrow\text{His}$]: a newly discovered high oxygen affinity variant. *Hemoglobin*, **24**:59.
- 160.Tamagnini, G., Ribeiro, M.L., Valente, V., Ramachandran, M., Wilson, J.B., Baysal, E., Gu, L.H. e Huisman, T.H.J. (1991). Hb Coimbra or alpha 2 beta 299 (G1)Asp-Glu, a newly discovered high oxygen affinity variant. *Hemoglobin*, **15**:487.

161. <http://globin.cse.psu.edu/globin/hbvar/menu.html>
162. Ribeiro, M.L., Cunha, E., Gonçalves, P., Martín Núñez, G., Fernández Galán, M.A., Tamagnini, G.P., Smetanina, N.S., Gu, L.H. e Huisman T.H.J. (1997). Hb Lepore-Baltimore (delta68Leu - beta84Thr) and Hb Lepore-Washington-Boston (delta87Gln- betaIVS-II-8) in Central Portugal and Spanish Alta Extremadura. *Hum. Genet.*, **99**:669.
163. Baglioni, C. (1962). The fusion of two peptide chains in Hemoglobin Lepore and its interpretation as a genetic deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **48**:1880.
164. Lanclos, K.D., Patterson, J., Efremov, G.D., Wong, S.C., Villegas, A., Ojwang, P.J., Wilson, J.B., Kutlar, F. e Huisman, T.H.J. (1987). Characterization of chromosomes with hybrid genes for Hb Lepore-Washington, Hb Lepore-Baltimore, Hb P-Nilotic, and Hb Kenya. *Hum. Genet.*, **77**:40.
165. Pootrakul, P., Winichagoon, P., Fucharoen, S., Pravatmuang, P., Piat A. e Wasi, P. (1981). Homozygous haemoglobin Constant Spring: a need for revision of concept. *Hum. Genet.*, **59**:250.
166. Oron-Karni, V., Filon, D., Rund, D. e Oppenheim, A. (1997). A novel mechanism generating short deletion/insertions following slippage is suggested by a mutation in the human α_2 -globin gene. *Hum. Mol. Gen.*, **6**:881.
167. Kihm, A.J., Kong, Y., Hong, W., Russel, J.E., Rouda, S., Adachi, K., Simon, M.C., Blobel, G.A. e Weiss, M.J. (2002). An abundant erythroid protein that stabilizes free alpha-haemoglobin. *Nature*, **417**:758.
168. Gell, D., Kong, Y., Eaton, S.A., Weiss, M.J. e Mackay, J.P. (2002). Biophysical characterization of the alpha-globin binding protein alpha-hemoglobin stabilizing protein. *J. Biol. Chem.*, **277**:40602.
169. Kong, Y., Katein, A.M., Loudon, C.S. e Weiss, M.J. (2003). Loss of alpha hemoglobin stabilizing protein exacerbates thalassemia phenotypes in mice. *Blood*, **102**:146.
170. Luzzato, L. e Norato, R. (2002). Haemoglobin's chaperone. *Nature*, **417**:703.
171. Galanello, R., Perseu, L., Giagu, N. e Sole, G. (2003). AHSP expression in beta-thalassemia carriers with thalassemia intermedia phenotype. *Blood*, **102**:1881.
172. Kong, Y., Zou, S., Kihm, A.J., Katein, A.M., Yu, X., Gell, D.A., Mackay, J.P., Adachi, K., Foster-Brown, L., Loudon, C.S., Gow, A.J. e Weiss, M.J. (2004). Loss of α -hemoglobin-stabilizing protein impairs erythropoiesis and exacerbates β -thalassemia. *J. Clin. Inv.*, **10**:1457.
173. Andrews, N.C., 2000. Iron hemostasis: insights from genetics and animal models. *Nat. Rev. Genet.*, **1**:208.
174. Wessling-Resnick, M. (2000). Iron transport. *Annu. Rev. Nutr.*, **20**:129.
175. Lee, P., Gelbart, T., West, C., Halloran, C. e Beutler, E. (1998). The human Nramp2 gene: characterization of the gene structure, alternative splicing, promoter region and polymorphisms. *Blood Cells, Mol. Dis.*, **24**:199.
176. Tchernitchko, D., Bourgeois, M., Martin, M. e Beaumont, C. (2002). Expression of the two mRNA isoforms of the iron transporter Nramp2/DMT1 in mice and function of the iron responsive element. *Biochem. J.*, **363**:449.

177. Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Vussberger, S., Gollan, J.L. e Hediger, M.A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, **388**:482.
178. Canonne-hergaux, F., Zhang, A-S., Ponka, P. e Gros, P. (2001). Characterization of the iron transporter DMT1 (NRAMP2/DCT1) in red blood cells of normal and anemic *mk/mk* mice. *Blood*, **98**: 3823.
179. Su, M, Trenor, C.C., Fleming, J.C., Fleming, M.D. e Andrews, N.C. (1998). The G185R mutation disrupts function of the iron transporter Nramp2. *Blood*, **92**:2157.
180. Fleming, M.D., Romano, M.A., Su, M.A., Garrick, L.M., Garrick, M.D. e Andrews, N.C. (1998). Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**:1148.
181. Canonne-hergaux, F., Gruenheid, S., Ponka, P. e Gros, P. (1999). Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood*, **93**: 4406.
182. Priwitzerova, M., Pospisilova, D., Prchal, J.T., Indrak, K., Hlobilkova, A., Mihal, V., Ponka, P. e Divoky, V. (2004). Severe hypochromic microcytic anemia caused by a congenital defect of the iron transport pathway in erythroid cells. *Blood*, **103**: 3991.
183. Mims, P.M., Guan, Y., Pospisilova, D., Priwitzerova, M., Indrak, K., Ponka, P., Divoky, V. e Prchal, J.T. (2004). Identification of a human mutation of DMT1 in a patient with microcytic anemia and iron overload. *Blood*, **105**:1337.
184. Conrad, M.E. e Umbreit, J.N. (2000). Iron absorption and transport- an update. *Am. J. Hematol.*, **64**:287.
185. Higgs, D.R., Vickers, M.A., Wilkie, A.O.M., Pretorius, I-M., Jarman, A.P. e Weatherall, D.J. (1989). A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. *Blood*, **73**:1081.
186. Bowden, D.K., Hill, A.V.S., Higgs, D.R., Oppenheimer, S.J., Weatherall, D.J. e Clegg, J.B. (1987). Different hamatologic phenotypes are associated with the leftward ($-\alpha^{4.2}$) and rightward ($-\alpha^{3.7}$) α^+ -thalassemia deletion. *J. Clin. Invest*, **79**:39.
187. Galanello, R., Paglietti, E., Melis, M.A., Giaga, L. E Cao, A. (1984). Hemoglobin inclusions in heterozygous α -thalassemia according to their α -globin genotype. *Acta Haematol.*, **72**:34.
188. Eleftheriou, A. (2003). About thalassaemia. *Thalassaemia International Federation Publications*, Nicosia.
189. Embury, S.H. (1989). α -Thalassemia. A modifier of sickle cell disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **565**:213.
190. Noguchi, C.T., Schechter, A.N., e Rodgers, G.P. (1993). Sickle cell disease pathophysiology. *In The Haemoglobinopathies*. Weatherall, D.J. e Higgs, D.R. (Eds). *Bailiere's Clinical Haematology*, vol.6, p. 57, W.B. Saunders Company. London.
191. Adekile, A.D. e Huisman, T.H.J. (1993). Hb F in sickle cell anemia. *Experientia*, **49**:16.

192. Ostertag, W. e Smith, E.W. (1969). Hemoglobin Lepore Baltimore, a third type of a $\delta\beta$ crossover ($\delta^{50}\beta^{86}$). *Eur. J. Biochem.*, **10**:371.
193. Barnabas, J. e Muller, C.J. (1962). Hemoglobin-Lepore Hollandia. *Nature*, **194**:931.
194. Efremov, G.D. (1978). Hemoglobin Lepore and anti-Lepore. *Hemoglobin*, **2**:197.
195. Zertal-Zidane, S., Ducrocq, R., Weil-Olivier, C., Elion, J. e Krishnamoorthy, R. (2001). A novel fusion gene expresses hemoglobin A (HbA) not Hb Lepore: Senegalese $\delta^{\circ}\beta^{+}$ thalassemia. *Blood*, **98**:1261.
196. Lacan, P., Francina, A., Promé, D., Delaunay, J., Galactéros, F. e Wajcman, H. (1996). Hb Aubenas [$\beta^{26}(B8)Glu\rightarrow Gly$]: a new variant normally synthesized, affecting the same codon as in Hb E. *Hemoglobin*, **20**:113.
197. Olds, R.J., Sura, T., Jackson, B., Wonke, B., Hoffbrand, A.V. e Thein, S.L. (1991). A novel δ° mutation in cis with Hb Knossos: a study of different genetic interactions in three Egyptian families. *Br. J. Haematol.*, **78**:430.
198. Old, J.M. e Higgs, D.R.. (1993). Gene analysis. *In* The thalassemias-methods in hematology, Weatherall, D.J. (Ed). Vol 6. p. 74-102. Churchill Livingstone, Oxford.
199. Tan, A.S.-C., Quah, T.C., Low, P.S. e Chong, S.S. (2001). A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for α -thalassemia. *Blood*, **98**:250.
200. Viprakasit, V., Tanphaichitr, V.S., Pung-Amritt, P., Petrarat, S., Suwantol, L., Fisher, C. e Higgs, D.R. (2002). Clinical phenotypes and molecular characterization of Hb H-Paksé disease. *Haematologica*, **87**:117.
201. Henke, W., Herdel, K., Jung, K., Schnorr, D. e Loening, S.A. (1997). Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, **25**:3957.
202. Orita, M., Iwahana, H., Kanazawat, H., Hayashi, K. e Sekiya, T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natd. Acad. Sci.*, **86**:2766.
203. Nicholls, R.D, Fishel-Ghodsian, N e Higgs, D.R. (1987). Recombination at the human α globin gene cluster: sequence features and topological constraints. *Cell*, **49**:369.
204. Winichagoon, P., Higgs, D.R, Goodbourn, S.E.Y., Clegg J.B., Weatherall, D.J. e Wasi, P. (1984). The molecular basis of α -thalassaemia in Thailand. *Embo J.* **3**:1813.
205. Clegg, J.B. (1993). Hemoglobin synthesis. *In* The thalassemias-methods in hematology. Weatherall, D.J. (Ed). Vol 6. p. 54-73. Churchill Livingstone, Oxford.
206. Weatherall, D.J. e Clegg, J.B. (1969). The pattern of disordered hemoglobin synthesis in homozygous and heterozygous β -thalassaemia. *Brit. J. Haemat.*, **16**:251.
207. Clegg, J.B., Nauthton, M.A. e Weatherall, D.J. (1968). Separation of the α and β -chains of human hemoglobin. *Nature*, **219**:69.
208. Galanello, R., Satta, S., Pirroni, M.G., Travi, M. e Maccioni, L. (1998). Globin chain synthesis analysis by high performance liquid chromatography in the screening of thalassemia syndromes. *Hemoglobin*, **22**:501.

209. Daliman, P.R. (1977). *In Pediatrics*. 16th Ed. Rudolph, A. (ed.), new York Appleton-Century-Crofts, p.Iiii.
210. Martin, G., González, F.A., Ropero, P., Hojas, R., Polo, M., Mateo, C., Benavente, C. and Villegas, A. (2004). Hb Plasencia [α_2 125(H8)Leu-Arg] una sustitución (T→G) en el codon 125 del gen α_2 α^+ talasemia. Communication presented in the XLVI National Reunion of Hematology and Hemophily of the Spanish Association / XX SETH Congress, Valencia, 21-23 Outubro 2004.