MARCILENE REZENDE SILVA

ESTUDO DE HEMOGLOBINAS VARIANTES COM MOBILIDADE ELETROFORÉTICA SEMELHANTE À DA HEMOGLOBINA S EM CRIANÇAS DO PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS (PTN-MG)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
BELO HORIZONTE
2012

MARCILENE REZENDE SILVA

ESTUDO DE HEMOGLOBINAS VARIANTES COM MOBILIDADE ELETROFORÉTICA SEMELHANTE À DA HEMOGLOBINA S EM CRIANÇAS DO PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS (PTN-MG)

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a qualificação de doutorado em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente

Orientador: Prof. Dr. Marcos Borato Viana

Professor Titular do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Co-orientador: Prof. Alvaro José Romanha

Professor da Universidade Federal de Santa Catarina e pesquisador associado do Centro de Pesquisa René Rachou - FIOCRUZ

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Clélio Campolina Diniz

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Ricardo Santiago Gomez

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Francisco José Penna

Chefe do Departamento de Pediatria: Profa. Benigna Maria de Oliveira

Coordenadora do Programa de Pós-graduação Saúde da Criança e do Adolescente: Profa. Ana Cristina Simões e Silva

Colegiado do Programa de Pós-graduação em Medicina – Área de Concentração Saúde da Criança e do Adolescente :

Profa. Ana Cristina Simões e Silva
Prof. Cássio da Cunha Ibiapina
Prof. Eduardo Araújo de Oliveira
Prof. Francisco José Penna
Prof. Jorge Andrade Pinto
Profa. Ivani Novato Silva
Prof. Marcos José Burle de Aguiar
Profa. Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana
Profa. Maria de Lourdes Melo Baeta

MARCILENE REZENDE SILVA

ESTUDO DE HEMOGLOBINAS VARIANTES COM MOBILIDADE ELETROFORÉTICA SEMELHANTE À DA HEMOGLOBINA-S EM CRIANÇAS DO PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS (PTN-MG)

BANCA EXAMINADORA

Prof. Marcos Borato Viana

Prof. Alvaro José Romanha

Profa. Maria de Fátima Sonati

Prof. Aderson da Silva Araujo

Profa. Benigna Maria de Oliveira

Profa. Ana Cristina Simões e Silva

Suplentes:

Profa. Débora Marques de Miranda

Profa. Marina Lobato Martins

Belo Horizonte, 03 de maio de 2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meus passos e colocar pessoas especiais no meu caminho, as quais me auxiliaram, orientaram e propiciaram uma caminhada de sucesso.

As crianças e aos pais ou responsáveis que aceitaram participar deste estudo.

Ao meu precioso orientador Prof. Marcos Borato Viana pela paciência, sábios ensinamentos, oportunidade de aprendizado, orientação, atenção, presença constante e apoio neste trabalho. Ao meu co-orientador Dr. Alvaro José Romanha que, mesmo de longe, esteve presente compartilhando conhecimentos e fornecendo sábios conselhos.

À Dra Cibele Velloso Rodrigues, Profa. Maria Helena da Cunha Ferraz e Fernanda Silva Pimentel pela colaboração neste estudo. A Juliana, Isabela, Shimene e Pedro por me auxiliarem no desenvolvimento do trabalho.

A todos os funcionários das unidades básicas de saúde dos 56 municípios que contribuíram para a busca ativa dos pais ou responsáveis, para a coleta e envio de sangue total a Belo Horizonte.

Ao Márcio, Toninho, Fabiana e Geraldinho do Laboratório de hematologia do Hospital das Clínicas pela ajuda incondicional fornecida sempre com muito carinho. A todos do Nupad-UFMG, em especial Leandro, Sandra e Fernanda do laboratório de hemoglobinopatias; Nara, Dora, Carlos e Amanda do laboratório de genética; Daniela, Juliana, Janaína, Cristiane, Ana Paula, e Fatinha do setor de controle de tratamento; João e Jacqueline da central de projetos; Silvânia, Bruna e Roberto da coordenação do laboratório de Triagem Neonatal; Belini e Anézio do setor de compras; Vinicius do setor de correspondência; Soraia do setor de treinamento; Vera Lúcia e Piedade do setor de documentação; Cláudia do setor de recepção de amostras; José Vicente, Bruno e Jeferson do setor de informática pelo auxílio na realização deste projeto.

A todos colegas e amigos (as) do setor de pesquisa da Fundação Hemominas pela convivência agradável, dúvidas compartilhadas e amizade. A Terezinha, Bia e Emanuele do laboratório de hematologia da Hemominas pela amizade e auxílio.

A todos colegas e amigos (as) do Centro de Pesquisa René Rachou pela ajuda recebida, convivência agradável e amizade.

A Flavianne, Marina Brito, Cli, Natália, Josiane, Ana Cláudia, Fernanda Freire e Fernanda Pimentel pela amizade, companheirismo, dúvidas compartilhadas e apoio em todos os momentos.

Ao Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da UFMG, na pessoa da coordenadora do Programa de Sáude da Criança e do Adolescente, Dra Ana Cristina Simões e Silva, pela oportunidade de aprendizado.

Ao Nupad, na pessoa do seu diretor Dr. Nelio Januário, pela possibilidade de desenvolver uma pesquisa no Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais.

Ao Setor de Pesquisa da Fundação Hemominas, na pessoa do seu chefe Dr. Daniel Gonçalvez Chavez, pela disponibilização da infraestrutura para a realização de parte dos experimentos laboratoriais deste trabalho.

Ao Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ, na pessoa do seu chefe Dr Guilherme Corrêa de Oliveira, pela disponibilização da infraestrutura para a realização de parte dos experimentos laboratoriais deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Pró-reitoria de Pesquisa da UFMG, CNPq e FAPEMIG pelo financiamento deste projeto.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Marcos José Burle Aguiar, Profa. Ana Cristina Simões e Silva e Profa. Benigna Maria de Oliveira por aceitarem o convite e dedicarem atenção a minha tese.

A minha mamãe e meu papai um agradecimento especial pelo amor, dom da vida, carinho, presença, ajuda, torcida e oportunidades. Ao Jonas pelo amor, paciência, carinho, estímulo e incentivo, e às minhas irmãs Josi, Dri, Lú, cunhados Ricardo, Antonino, Iguatinan e sobrinhas Fernanda, Caroline, Fernanda, Luana e Maria Paula pelos momentos de descontração, apoio, torcida e carinho.

A tia Cida, João, Vinicius, Carla, Ana Rita, Cliviany, Josana, Johan, Quincas, Renato, Sara, Alessandra e a todos amigos e familiares que me incentivaram nesta caminhada.

Enfim, muito obrigada a todos que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Introdução: Algumas hemoglobinas (Hb) variantes apresentam mobilidade eletroforética semelhante à da Hb S, o que pode levar ao falso diagnóstico de traço ou doença falciforme. A maioria dos indivíduos possuidores das Hbs variantes é assintomática, mas em vários casos a Hb está associada à alfa-talassemia, o que pode resultar em alterações hematológicas. A associação de Hb variante com a Hb S ou Hb C pode determinar quadros clínicos e/ou laboratoriais complexos. **Objetivo e Métodos:** O objetivo deste estudo foi determinar a frequência das variantes de hemoglobina detectadas no Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais com mobilidade elétrica similar à da Hb S. O DNA de 118 crianças foi utilizado para verificar a presença do alelo β^S. O diagnóstico de alfa-talassemia do tipo 3.7 ou 4.2 foi realizado por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplex do tipo *gap (gap*-PCR multiplex*)*. Os produtos dessa PCR foram então digeridos com endonucleases de restrição para detectar as mutações correspondentes à Stanleyville-II e Hasharon, já descritas no Brasil. Nos casos negativos para essas Hbs fez-se sequenciamento dos genes *HBA* ou *HBB*. Dados clínicos foram obtidos das crianças que compareceram à consulta clínica na Fundação Hemominas. **Resultados:** Das 118, apenas 6 crianças apresentaram a Hb S. Dentre as 112 foram encontradas duas crianças, (1,8%) com Hb Stanleyville-II em homozigose ($-\alpha^{3.7;Stanleyville}/-\alpha^{3.7;Stanleyville}$) e outras 94 (84%) com Stanleyville-II em heterozigose (84 têm genótipo $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7;Stanleyville}$, cinco $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7;Stanleyville}$ e cinco $\alpha^{Stanleyville}\alpha/\alpha\alpha$) Dentre os 112 casos, seis apresentavam Hb Hasharon em heterozigose (todas $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7Hasharon-}$). Detectaram-se ainda cinco casos com Hb Ottawa, um com Hb St Luke's e um com Hb Etobicoke, todas variantes de cadeia α, em heterozigose e genótipo αα/αα. Hb G-Ferrara foi encontrada em duas crianças (uma $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ e outra αα/αα) e Hb Maputo ($\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$)em uma, ambas variantes β e em heterozigose. Dentre as hemoglobinas citadas acima, foram encontradas cinco associações com a Hb S: em três crianças com Hb Stanleyville-II, uma Ottawa e uma St Luke's. A Hb Etobicoke foi encontrada em uma criança que possui o alelo híbrido α*212*. Não foi observada nenhuma alteração clínica decorrente dessas associações. Em várias crianças com Hb Stanleyville-II, todas com ancestralidade africana, foram observadas microcitose e hipocromia, devido a associação com a alfa talassemia do tipo 3.7. Foi estabelecida PCR-RFLP (Polimorfismo de Fragmento de Restrição) para a identificação de todas as hemoglobinas, com exceção da hemoglobina G-Ferrara. **Conclusões:** 1. Hemoglobina Stanleyville-II é relativamente comum em Minas Gerais (incidência de 1:11.500); 2. A

presença das Hbs Stanleyville-II, Ottawa, Maputo, G-Ferrara, Hasharon, Etobicoke e St Luke's pode levar a falso diagnóstico de traço ou doença falciforme, necessitando-se de testes adicionais para o diagnóstico diferencial correto; 3. A presença dessas Hbs parece não possuir relevância clínica, mesmo nos casos encontrados neste estudo quando se detectou associação das Hbs variantes St Luke's, Stanleyville-II e Ottawa com a Hb S; 4. Hipocromia e microcitose, observadas em várias crianças, são devidas à co-herança de α-talassemia e não à presença da Hb Stanleyville-II; 5. Foram encontrados casos assintomáticos de Hb Maputo e G- Ferrara em heterozigose com a Hb A. Os pais dessas crianças receberam orientação genética sobre a possibilidade das crianças terem filhos com doença falciforme se houver co-herança com a Hb S; 6. A PCR-RFLP pode ser utilizada como método diagnóstico para todas as Hbs variantes identificadas neste estudo, com exceção da Hb G-Ferrara.

ABSTRACT

Introduction: Some hemoglobin (Hb) variants have similar electrophoretic mobility to that of Hb S ("S-like"), which can lead to false diagnosis of sickle cell trait or disease. Most individuals with Hb variants are asymptomatic, but in several cases the Hb is associated with alpha-thalassemia and may result in hematological changes. The association of a Hb variant with the Hb S or Hb C may result in complex clinical and/or laboratory features. **Objective and Methods:** The aim of this study was to determine the frequency of S-like Hb variants detected in the Newborn Screening Program in Minas Gerais and to assess the clinical relevance of these Hbs. The DNA from 118 children was tested for the β^S allele. Alpha-thalassemia types 3.7 or 4.2 were tested in 112 children in 56 cities in Minas Gerais by mutiplex gap-PCR. The products of this PCR were then digested with restriction endonucleases to detect the mutations corresponding to Hb Stanleyville-II and Hb Hasharon, both already reported in Brazil. In the remaining cases sequencing of *HBB* or *HBA* genes was necessary to identify the Hb variant. Clinical data were obtained from children who attended medical consultations at Hemominas Foundation. **Results:** Of the 118 children, only six were positive for the β^S allele without any other variant. Among the remaining 112 children there were two children (1.8%) with homozygous Hb Stanleyville-II ($-\alpha^{3.7;\ Stanleyville}/-\alpha^{3.7;\ Stanleyville}$), 94 (84%) with heterozygous Stanleyville-II (genotypes: 84 $\alpha\alpha$ / $-\alpha^{3.7;\ Stanleyville}$, five $-\alpha^{3.7}$ / $-\alpha^{3.7;\ Stanleyville}$ and five $\alpha^{Stanleyville}\alpha/\alpha\alpha$), and six heterozygous Hb Hasharon (all $\alpha\alpha$ / $-\alpha^{3.7;\ Hasharon}$). Five cases with Hb Ottawa, one with Hb St. Luke's and one with Hb Etobicoke, all α-chain variants in heterozygosis and genotype $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, were also identified. Hb G-Ferrara was identified in two children (one $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ and the other $\alpha\alpha/\alpha\alpha$) and Maputo Hb ($\alpha\alpha$ / $-\alpha^{3.7}$) in one, both β variants in heterozygosis. Among the above mentioned Hbs, there were five associations with the β^S allele: three children with Hb Stanleyville-II, one with Hb Ottawa and one with Hb St Luke's. Hb Etobicoke was found in a child who has a hybrid α*212* gene. There was no clinical change due to these associations. In several children with Hb Stanleyville-II, all from African ancestry, microcytosis and hypochromia were observed because of the association with a 3.7 alpha thalassemia gene. PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) with specific endonucleases confirmed all mutations underlying the variant Hbs, with the exception of Hb G-Ferrara, for which no diagnostic endonuclease was found. **Conclusions:** 1. Hemoglobin Stanleyville-II is relatively common in Minas Gerais (incidence of 1:11,500); 2. Hbs Stanleyville-II, Ottawa, Maputo, G-Ferrara, Hasharon, Etobicoke and St.

Luke's can lead to false diagnosis of sickle cell trait or disease in newborn screening, unless additional tests for a correct diagnosis are used; 3. These Hbs seem to have no clinical relevance, even when found in combination with the β^S allele, as happened in this study with the Hb St Luke's, Stanleyville-II, and Ottawa; 4. Hypochromia and microcytosis detected in several children are due to the co-inheritance of α-thalassemia and not to the presence of Hb Stanleyville-II; 5. Asymptomatic cases of heterozygous Hb Maputo and Hb G-Ferrara were identified. Genetic counseling about the possibility of having children or grandchildren with sickle cell disease if the β^S allele is co-inherited was given to these families; 6. Specific PCR-RFLP may be used as a diagnostic tool for all variant Hbs identified in the present study, except for Hb G-Ferrara.

SUMÁRIO

página

Resumo..... vii

Abstract..... ix

Lista de abreviaturas e siglas..... xv

Lista de tabelas..... xvii

Lista de figuras..... xviii

1- INTRODUÇÃO..... 1

2- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO..... 3

3- REVISÃO DE LITERATURA..... 4

3.1- Hemoglobinopatias..... 4

3.2- Triagem neonatal para hemoglobinopatias..... 6

3.2.1- Método laboratoriais para a triagem neonatal das hemoglobinopatias 6

3.3- Hemoglobinas variantes incomuns..... 8

3.4- Doença falciforme..... 10

3.5- Hemoglobina Stanleyville-II..... 10

3.5.1- Associação da Hb Stanleyville-II com outras hemoglobinopatias..... 14

3.6- Hemoglobina Hasharon 15

3.7- Hemoglobina Ottawa..... 17

3.8- Hemoglobina Maputo..... 18

3.9- Hemoglobina G-Ferrara..... 19

3.10- Hemoglobina St Luke's..... 20

3.11- Hemoglobina Etobicoke..... 21

3.12- Hemoglobina Rush..... 21

3.13- Alfa talassemia..... 23

4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA 26

5- OBJETIVO GERAL..... 36

5.1- Objetivos específicos..... 36

6- PACIENTES E MÉTODOS..... 37

6.1- Aspectos éticos..... 37

6.2- População estudada..... 37

6.3- Diagnóstico de hemoglobinopatias em Minas Gerais..... 39

6..3.1- Cromatografia líquida de alta resolução (hpcl) - kit *variant tm sickle cell short program* 41
6.3.2- Eletroforese por focalização isoelétrica (IEF) - *hemoglobin test kit*..... 41
6.4- Contato com as unidades básicas de saúde 42
6.5- Dados clínicos e laboratoriais..... 43
6.6- Eletroforese de hemoglobina..... 44
6.7- Eletroforese de cadeia globínica..... 44
6.8- Isolamento de DNA genômico..... 45
6.8.1- Método fenol/clorofórmio..... 46
6.8.2- Kit comercial QIAAMP® DNA *blood mini kit* (QIAGEN)..... 47
6.9- Dosagem das amostras de DNA..... 47
6.10- Diagnóstico molecular de alfa talassemia..... 48
6.11- Estudo dos genes *HBB* e *HBA* 50
6.12- Sequenciamento de DNA..... 52
6.13- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) - polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (RFLP)..... 54
6.14- Métodos estatísticos..... 56
6.15- Financiamento..... 57
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA METODOLOGIA..... 58
8- ARTIGO 1: Hemoglobin Stanleyville-II [alpha2 78 (EF7) Asn> Lys; HbA2: c.237C>A]: incidence of 1:11,500 in a newborn screening program in Brazil..... 61
9- ARTIGO 2: Unstable hemoglobin Rush [beta 101(G3) Glu>Gln, HBB:c.304G>C] in a Brazilian family with moderate hemolytic anemia..... 62
10- ARTIGO 3: Homozygous Hb Stanleyville-II [alpha2 78(EF7) Asn>Lys; HBA2:c.237C>A, not C>G] associated with genotype -α3.7/-α3.7 in two Brazilian families..... 63
11- ARTIGO 4: Hb Etobicoke mutation in a hybrid *HBA212* allele [*HBA212* 84 (F5) Ser>Arg; *HBA212*: c.255C>G] 64
12- ARTIGO 5: Descrição clínico-molecular das hemoglobinas Maputo [beta47 (CD6) Asp>Tyr HBB 142G>T] e G-Ferrara [beta57 (E1) Asn>Lys HBB 174C>A] no Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais …….. 65
13- OUTROS ARTIGOS..... 77
14- CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS E CONCLUSÕES..... 78

15- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DAS CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS E CONCLUSÕES..... 84
16- ANEXOS..... 85
16.1- Termo de consentimento livre e esclarecido..... 85
16.2- Parecer do COEP-UFMG..... 87
16.3- Parecer do CEP-Hemominas..... 88
16.4- Carta de orientação a unidade básica de saúde para coleta de sangue total..... 89
16.5- - Exemplo de carta aos pais explicando o porquê da necessidade de nova coleta de sangue total..... 91
16.6- Exemplo de carta de retorno da pesquisa para a unidade básica de saúde..... 92
16.7- Exemplo de carta de retorno da pesquisa para os pais..... 93
16-8- Média dos valores hematológicos das crianças com Hb Stanleyville-II que foram atendidas em consulta médica..... 94
16.9- Cópia da ata de defesa de tese..... 95
16.10- Cópia da declaração de aprovação da defesa de tese..... 96
17 - APÊNDICES..... 97
17.1- Resultados das eletroforeses de hemoglobina..... 97
17.2- Eletroforese de cadeia globínica..... 101
17.3- Produtos de PCR e PCR-RFLP realizados para detectar as hemoglobinas variantes..... 102
17.4- Resultados dos sequenciamentos de DNA..... 109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α tal- Alfa-talassemia

µL- microlitros

µM- micromolar

A- adenina

ARG- arginina

BH- Belo Horizonte

BLAST- *Basic local alignment search tool*

C- Citosina

CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEHMOB- Centro de Educação e Apoio para Hemoglobinopatias

CGP- Centro Geral de Pediatria

CNPQ- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COEP- Comitê de Ética em Pesquisa

DCIP- 2,6-diclorofenol inositol

DNA- *Deoxyribonucleic acid*- ácido desoxirribonucleico

dNTP- *deoxynucleotide triphosphate*- desoxirribonucleotídeo trifosfatado

EDTA- Ethylenediamine tetracetic acid- ácido etilenodiamino tetra-acético

fL- fentolitros

FAPEMIG- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FUNDEP- Fundação de Desenvolvimento à Pesquisa

G- guanina

GLU- ácido glutâmico

GLY- glicina

Hb- hemoglobina

HBA- gene alfa da hemoglobina

HBA1-gene alfa 1 da hemoglobina

HBA2- gene alfa 2 da hemoglobina

Hb A- hemoglobina do tipo A

Hb A_2- hemoglobina do tipo A_2-

Hb AS- traço falciforme

HBB- gene beta da hemoglobina

Hb C- hemoglobina do tipo C

Hb E- hemoglobina do tipo E

Hb F- hemoglobina fetal

HBG- gene gama da hemoglobina

HCM- Hemoglobina corpuscular média

HPLC- Cromatografia líquida de alta resolução

IEF- *Isoelectric Focusing*- eletroforese por focalização isoelétrica

MG- Minas Gerais

$MgCl_2$- cloreto de magnésio

min- minutos

mM- milimolar

NaCl- cloreto de sódio

NCBI- *National Center for Biotechnology Information*

Nupad- Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico

PCR- Reação em cadeia da polimerase

pH- potencial de hidrogênio iônico

pI- ponto isoelétrico

PNTN- Programa Nacional de Triagem Neonatal

PRO- prolina

PTN-MG- Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais

RFLP- Polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição

RPM- rotações por minuto

seg- segundo

T- timina

Tris- hidroximetil aminometano

Tris HCl- tris hidrocloreto

SDS- sulfato duodecil de sódio

U- unidade

UBS- Unidade básica de saúde

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

VAL- valina

VCM- Volume corpuscular médio

LISTA DE TABELAS

página

Tabela 1- Hemoglobinas variantes citadas no revisão da literatura as respectivas alterações genética e apresentação clínica..... 23

Tabela 2- Sequência de iniciadores utilizados para o diagnóstico molecular da alfa-talassemia, respectivas concentrações utilizadas nas reações de PCR e tamanho esperados dos fragmentos amplificados..... 49

Tabela 3- Iniciadores utilizados para o estudo dos genes *HBB*..... 51

Tabela 4- Iniciadores utilizados para o estudo dos genes *HBA1* e *HBA2*..... 51

Tabela 5- Dados das enzimas utilizadas para detectar a presença das mutações que codificam as respectivas hemoglobinas variantes e fragmentos obtidos com a restrição enzimática..... 56

LISTA DE FIGURAS

página

Figura 1- Representação dos cromossomos humanos 11 e 16, localização dos respectivos genes da hemoglobina e cadeias globínicas presentes em diferentes fases da vida humana (Higgs, 2004)..... 4

Figura 2- Representação gráfica da expressão dos genes da hemoglobina humana nas diferentes fases da vida (Orkin *et al*., 2009)..... 5

Figura 3- Localização dos genes *HBA2* e *HBA1* no cromossomo 16 e destaque para as regiões homólogas duplicadas (X, Y, Z) e regiões não homológas (I, II e III). A extensão de cada deleção alfa talassêmica é representada pelas caixas sólidas (Higgs *et al*., 1989)..... 24

Figura 4- Visão parcial de gel de IEF contendo Hb variante. A- Resultado da triagem neonatal ao nascimento. B- Resultado do 6º mês de vida..... 38

Figura 5- Fluxograma contendo explicações sobre a população estudada..... 39

Figura 6- Ilustração do *cluster* alfa, extensão das deleções e posição dos iniciadores (Tan *et al.,* 2001) 49

Figura 7- Distribuição geográfica das Hbs variantes com ponto isoelétrico semelhante ao da Hb S encontradas no presente estudo. A- Localização dos casos de Hb Stanleyville-II. Os números entre parênteses representam a quantidade de crianças diagnosticadas correspondentes a cada asterisco vermelho. B- Localização dos casos de Hb Maputo, G-Ferrara, St Luke's, Etobicoke, Ottawa e Hasharon. Cada criança diagnosticada corresponde a um asterisco cujas cores representam a hemoglobina variante encontrada (ver legenda interna à figura)..... 79

1- INTRODUÇÃO

O Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (Nupad) é órgão complementar da Faculdade de Medicina da UFMG e serviço de referência em triagem neonatal de Minas Gerais, credenciado pelo Ministério da Saúde. O Nupad foi criado em 1993 e vem desenvolvendo trabalho com significativo destaque na saúde pública, principalmente por sua amplitude no atendimento maciço e gratuito a toda população mineira.

O Nupad possui um banco de dados do qual constam nomes da criança e da mãe, endereço, unidade básica de saúde (UBS) em que se colheram as amostras de sangue em papel filtro e resultados dos exames laboratoriais. Isso torna possível manter contato com os profissionais das 853 secretarias municipais de saúde, o que permite a localização das crianças e uma comunicação para solicitar novas amostras quando necessárias, "busca ativa" imediata das crianças detectadas como suspeitas de casos com potencial significado clínico, agendamento de consultas, distribuição gratuita de medicamentos aos doentes e estudo dos dados estatísticos gerados pelo sistema de informação do Nupad.

A triagem para hemoglobinopatias foi implantada no programa de triagem neonatal de Minas Gerais (PTN-MG) em março de 1998. A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e a focalização isoelétrica (IEF) eram os métodos de escolha para a triagem neonatal das hemoglobinopatias e, em especial, da doença falciforme no PTN-MG. Esses métodos apresentam elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico neonatal das hemoglobinas variantes de maior frequência e importância clínica: Hb S, Hb C, Hb D, Hb E. No entanto, outras variantes incomuns são detectadas por esses métodos, especialmente pela IEF.

No período de 03/1998 a 06/2008, foi realizado o teste de triagem para doença falciforme e outras hemoglobinopatias em 2.752.731 crianças, tendo sido detectados 1.978 casos de doença falciforme, 91.754 de portadores do traço falciforme e 1.637 resultados que, aparentemente, representavam hemoglobinas variantes triadas pelos métodos utilizados − HPLC e IEF, mas não identificadas. Os resultados são liberados como hemoglobinas variantes indeterminadas ("ind") e nova coleta no sexto mês de vida para elucidação do diagnóstico é solicitada, o que pode gerar insegurança e incerteza nas mães dessas crianças. A maioria das Hbs variantes são assintomáticas. Em associação com outras hemoglobinopatias e talassemias, entretanto, pode resultar

em doença grave (Fucharoen *et al.*, 2007). Além disso, existem dezenas de Hb variantes que podem ser confundidas com a Hb S por apresentar ponto isoelétrico muito semelhante ao da Hb S, o que pode causar falso diagnóstico de doença falciforme se não forem devidamente confirmadas (Halbrecht *et al.*, 1967; Bannister *et al.*, 1972; Canizares *et al.*, 1983; Marinucci *et al.*, 1983; Hocking, 1997; Chinelato-Fernandes & Bonini-Domingos, 2005; Jorge *et al*., 2007; Fucharoen *et al.*, 2007).

A identificação de Hbs variantes que ocorrem em Minas Gerais e a verificação da presença ou ausência da relevância clínica dessas hemoglobinas são importantes. A observação de quais Hbs com ponto isoelétrico semelhante a HbS ocorrem em MG é essencial para evitar falso diagnóstico de traço falciforme. Além disso, concentração inusitada de uma determinada variante em uma região de Minas Gerais pode indicar a origem étnica daquela população, o que proporciona inferências sociais e econômicas e contribui para o conhecimento da diversidade genética da população brasileira.

Esta tese de doutorado foi elaborada no formato de artigos, sendo estruturada em Introdução, Revisão da Literatura, Objetivos, Métodos, Resultados e Discussão, sob a forma de artigos, Considerações Adicionais e Conclusões, Anexos e Apêndices.

2- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

Bannister, W. H., J. L. Grech, et al. Hemoglobin St Luke's, or alpha 2 , 95 Arg (G2) beta 2. Eur J Biochem 1972 29(2):301-7.

Canizares, M. E., G. Martinez, et al. [Hemoglobinopathy S with an interaction of HbS and Hb G-Ferrara]. Sangre 1983 28(6):770-4.

Chinelato-Fernandes, A. R. & C. Bonini-Domingos. Contribuição do estudo molecular de Hemoglobinas S-like para o conhecimento da diversidade genética da população brasileira. Rev Bras Hematol Hemot 2005 27(3):208-12.

Fucharoen, S., S. Singsanan, et al. Rapid molecular characterization of Hb Queens and Hb Siam: two variants easily misidentified as sickle Hb. Clin Biochem 2007 40(1-2): 137-40.

Halbrecht, I., W. A. Isaacs, et al. Hemoglobin hasharon (alpha-47 aspartic acid--histidine). Isr J Med Sci 1967 3(6):827-31.

Hocking, D. R. The separation and identification of hemoglobin variants by isoelectric focusin electrophoresis: an interpretive guide. (1997). 115p.

Marinucci, M., J. P. Boissel, et al. Hemoglobin Maputo: a new beta-chain variant (alpha 2 beta 2 47 (CD6) Asp replaced by Tyr) in combination with hemoglobin S, identified by high performance liquid chromatography (HPLC). Hemoglobin 1983 7(5):423-33.

3- REVISÃO DA LITERATURA

3.1- HEMOGLOBINOPATIAS

A hemoglobina humana normal é um tetrâmero composto por duas cadeias polipeptídicas alfa (α), ou semelhantes a α e duas cadeias não-α. No adulto, a hemoglobina é formada por duas cadeias α de 141 aminoácidos e duas cadeias β de 146 aminoácidos. Os genes da cadeia α estão localizados no cromossomo 16, assim como o gene zeta (ζ), similar a α. O cromossomo 11 apresenta o *locus* ocupado pelo gene responsável pela produção da cadeia beta (β), bem como aqueles genes similares a β (épsilon - ε; gama - γ e delta - δ) (Weatherall & Clegg, 2001) (Figura **1).**

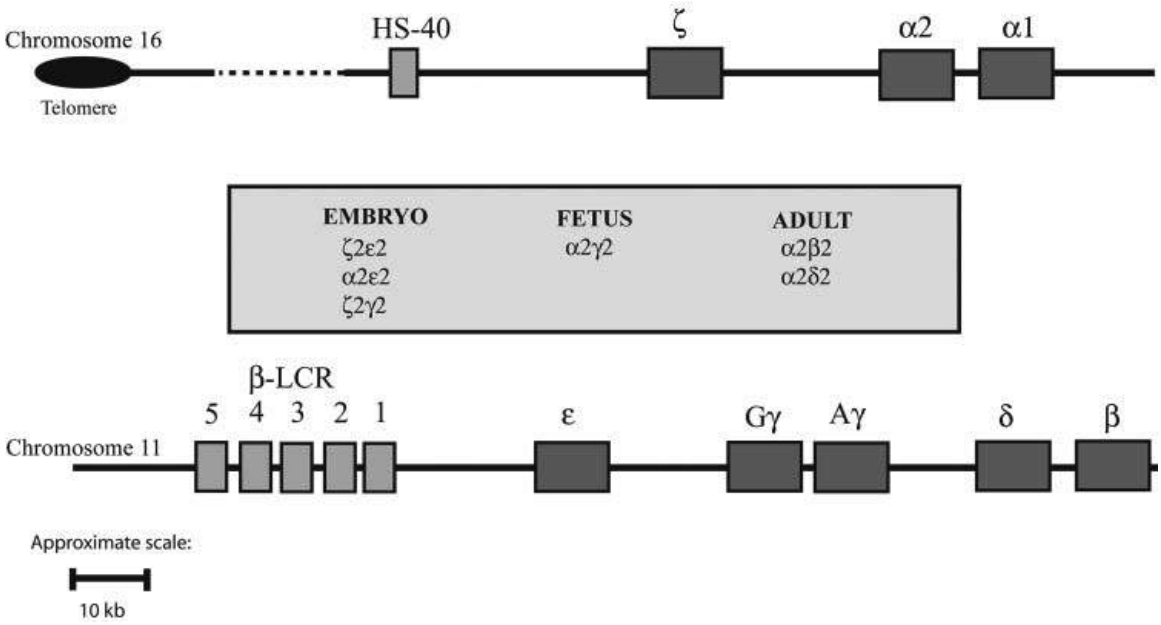


Figura 1- Representação dos cromossomos humanos 11 e 16, localização dos respectivos genes da hemoglobina e cadeias globínicas presentes em diferentes fases da vida humana (Higgs, 2004).

A estrutura da hemoglobina humana muda de composição, conforme o indivíduo esteja na fase embrionária, fetal ou adulta. Ela depende dos genes expressos em cada uma dessas fases e, consequentemente, das cadeias do tetrâmero produzidas. Na fase embrionária precoce, a eritropoiese ocorre no saco vitelino e os genes das globinas ζ e ε se expressam. Na fase subsequente há expressão dos genes α (*HBA*) e γ (*HBG*). Assim, as hemoglobinas que predominam são a Gower 1 (ε2ζ2), Gower 2 (α2ε2) e Portland

(ζ2γ2). Após essa fase, a síntese de cadeias ζ e ε é interrompida e apenas os genes *HBA* e *HBG* continuam a ser expressos. A eritropoiese se desloca para o fígado e baço fetal e, ao longo dessa fase, a Hb Fetal (Hb F) (α2γ2) é a predominante. Ao nascimento ela representa cerca de 80% da hemoglobina total produzida. A partir do nascimento, a síntese da cadeia γ diminui progressivamente, sendo que, na vida adulta, a principal hemoglobina é a do tipo A (α2β2) que, em geral, representa 96% a 99% do total da hemoglobina de um adulto normal. A hemoglobina do tipo A_2 (α2δ2) totaliza 1 a 3% do restante e a Hb F passa a representar, então, menos de 1% da hemoglobina total produzida (Weatherall & Clegg, 2001). Ao longo do desenvolvimento humano, a expressão coordenada dos genes semelhantes a alfa e beta globinas é essencial para uma concentração balanceada e adequada da Hb dentro dos eritrócitos (Clark & Thein, 2004) (Figura 2).

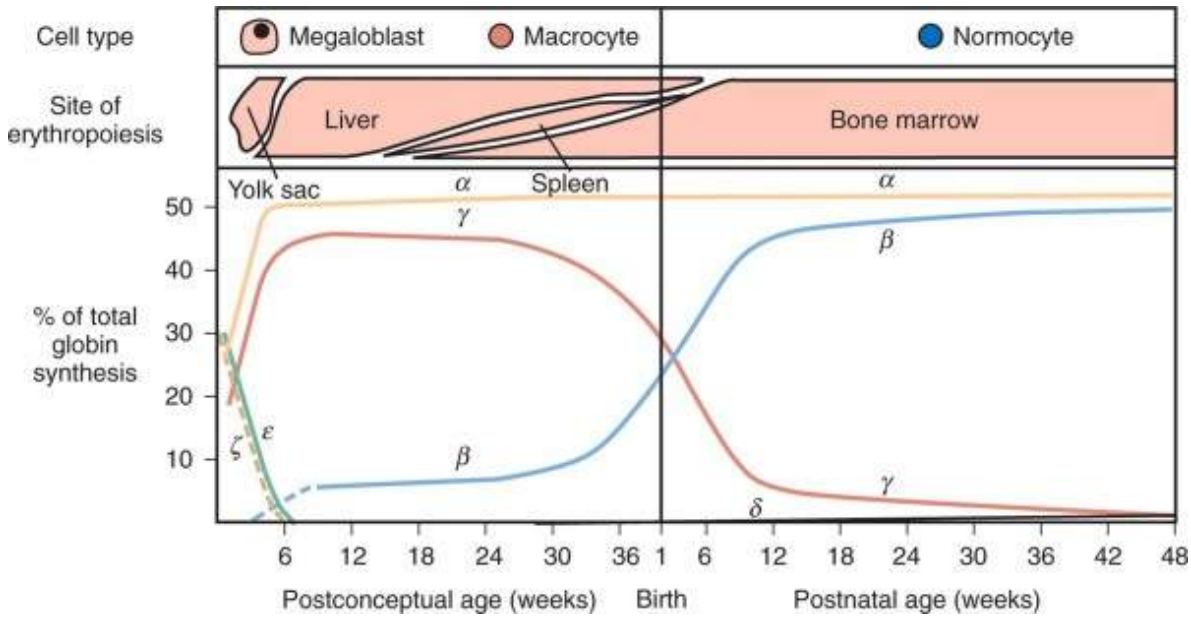


Figura 2- Representação gráfica da expressão diferencial dos genes da hemoglobina humana nas diferentes fases da vida (Cunningham *et al*., 2009).

As hemoglobinopatias constituem um grupo heterogêneo de doenças causadas por uma interrupção do padrão normal de expressão dos genes. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, cerca de 7% da população mundial é portadora de genes subjacentes a tais distúrbios (Weatherall & Clegg, 2001).

As hemoglobinopatias podem ser divididas, fundamentalmente, em dois grupos: a) as variantes estruturais, em que a alteração na estrutura da hemoglobina se dá pela

substituição de um aminoácido em uma de suas cadeias polipeptídicas e b) as hemoglobinopatias por deficiências de síntese ou talassemias, em que ocorre desequilíbrio na produção de uma ou mais cadeias da globina (Sonati & Costa, 2008).

3.2- **TRIAGEM NEONATAL PARA HEMOGLOBINOPATIAS**

Em junho de 2001 o Ministério da Saúde brasileiro, por meio da portaria nº 822/01, efetivou a inclusão da triagem para hemoglobinopatias no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), antes limitado à investigação da fenilcetonúria e do hipotireoidismo congênito (Ramalho *et al.,* 2003).

Apesar do principal objetivo dos programas de triagem neonatal para hemoglobinopatias estar focado na detecção de recém-nascidos com doença falciforme, os métodos laboratoriais utilizados na triagem permitem detectar os portadores do traço, que constituem parcela significativa da população (Murao & Ferraz, 2007).

O estado de Minas Gerais foi pioneiro no Brasil na implantação da triagem neonatal para doença falciforme e outras hemoglobinopatias. O início do programa ocorreu em março de 1998 e foi considerado por Serjeant e colaboradores (2005) estado modelo.

3.2.1- MÉTODO LABORATORIAIS PARA A TRIAGEM NEONATAL DAS HEMOGLOBINOPATIAS

Os programas para a triagem das hemoglobinopatias no Brasil, em especial a triagem neonatal, utilizam a eletroforese de hemoglobina ou a HPLC de troca iônica, como os principais métodos para a identificação e diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias.

A detecção das hemoglobinas é feita, além de outros princípios físico-químicos, a partir de diferenças na carga elétrica das diversas variantes, em função da troca de aminoácidos ocorrida (Hocking, 1997; Kimura *et al.,* 2008). Portanto, nem todas as variantes podem ser detectadas por meio desse princípio, pois mutações “silenciosas” podem resultar em trocas que acarretam pequena ou nenhuma diferença de carga elétrica, devido a substituições de aminoácidos neutros, o que dificulta ou impossibilita a detecção dessas variantes (Hocking, 1997).

A cromatografia (HPLC) e a IEF eram os métodos utilizado pelo PTN-MG para

a triagem neonatal das hemoglobinopatias e, em especial, da doença falciforme. Esses métodos apresentam elevada sensibilidade e especificidade (Campbell *et al.,* 1999; Ou & Rognerud, 2001), ambas superiores a 99,9%, para o diagnóstico neonatal das hemoglobinas variantes de maior frequência e importância clínica: Hb S, Hb C, Hb D e Hb E. Outras variantes menos comuns podem ser detectadas por esses métodos, especialmente pela IEF.

A IEF é considerada método eficiente para a detecção tanto das hemoglobinas normais como das hemoglobinas variantes, além de possibilitar a distinção de homozigotos e heterozigotos e identificar frações em baixa concentração, como por exemplo a Hb A_2. É um método que possui alto poder de resolução e nítida separação de bandas, sendo capaz de diferenciar fenótipos de hemoglobinas na dependência do ponto isoelétrico (pI) de cada fração. É técnica relativamente simples, rápida e de custo-benefício favorável quando utilizada em larga escala (Paixão *et al.,* 2001).

Apesar da elevada sensibilidade e especificidade do método na identificação da hemoglobina S, a ocorrência de sobreposição de bandas não é desprezível. Existem mais de 100 Hbs, como por exemplo, G Galveston, G Norfolk, Stanleyville-II (Dherte *et al*., 1959), Hasharon (Bonini-Domingos & Chinelato-Fernandes, 2005), Maputo (Marinucci *et al.,* 1983; Moo-Penn *et al.,* 1991), Queen, Ottawa (Fucharoen *et al.,* 2007), G-Ferrara (Canizares *et al.,* 1983), St Luke's (Bannister *et al.,* 1972), Etobicoke (Crookston *et al.,* 1969) que podem ser confundidas com a HbS por apresentarem praticamente a mesma posição na corrida eletroforética.

O PTN-MG utiliza a focalização isoelétrica *Wallac Resolve Systems*® (Ohio, EUA), *Resolve Neonatal Hemoglobin Screen Kit* (*Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Finland*) e foi o pioneiro no Brasil a utilizar a IEF como método de triagem neonatal em larga escala. Paixão *et al.* (2001) confirmaram a confiabilidade do método em distinguir traços para as hemoglobinas AS, AC e AD de outras variantes, e da combinação com a beta talassemia.

O sistema automatizado de HPLC *Variant* (*BioRad*), *kit Sickle Cell Disease*, foi utilizado por muito tempo pelo PTN-MG. Esse sistema é bastante sensível na identificação de Hbs na triagem neonatal, a partir de sangue em papel filtro. Ela é capaz de detectar pequenas concentrações de frações hemoglobínicas (Melo *et al.,* 2008), mesmo na presença de elevada concentração de hemoglobina fetal, característica do período neonatal. Por ser um sistema automatizado, há processamento rápido das amostras com alto índice de reprodutibilidade e exatidão (Araujo *et al.,* 2004). No

entanto, como o método não se propõe à detecção e identificação de outras variantes incomuns, existe a possibilidade de falhas no diagnóstico neonatal.

Apesar da elevada sensibilidade e especificidade da IEF e HPLC, alguns fatores podem interferir nos resultados, tais como a prematuridade extrema, transfusão sanguínea anterior à coleta de sangue, troca de amostras (Murao & Ferraz, 2007) e falta de qualificação da equipe técnica para análise dos resultados. O ideal seria que todo laboratório de triagem trabalhasse com dois métodos, sendo um de uso rotineiro e o outro para complementação, nos casos duvidosos. É recomendável que todos os casos que apresentem padrão hemoglobínico inconclusivo ou duvidoso pela técnica inicialmente utilizada sejam avaliados pelo outro método, de forma a aumentar a sensibilidade e a especificidade dos resultados da triagem (Murao & Ferraz, 2007).

3.3- HEMOGLOBINAS VARIANTES

As hemoglobinas variantes são resultado de mudanças na sequência de aminoácidos das cadeias α, β, γ ou δ dos tetrâmeros das hemoglobinas A, F e A_2. As variantes são causadas por alterações nos nucleotídeos do DNA, tais como deleções, inserções e mutações de ponto em um dos genes estruturais de globina (Hocking, 1997).

A Hb S é a mais frequente hemoglobina variante conhecida no homem. Ocorre como resultado de uma mutação de ponto no gene da β globina, que leva à troca de um único aminoácido na sexta posição da cadeia polipeptídica (β6 ácido glutâmico → valina). Os eritrócitos que possuem tal hemoglobina sofrem um processo de falcização, provocado pela baixa tensão de oxigênio, acidose e desidratação (Stuart & Nagel, 2004). As Hbs que ocorrem em baixa frequência são chamadas de Hb variantes incomuns.

Em consulta feita ao *Globin Gene Server (http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter)* estão arroladas 1.149 hemoglobinas variantes até 30 de março de 2012. As consequências das alterações estruturais nas propriedades físico-químicas da molécula estão na dependência da natureza do processo mutacional e do local em que ele ocorre. As consequências podem ser anemia hemolítica, quando a alteração determina instabilidade do tetrâmero da hemoglobina; transporte de oxigênio alterado, se há aumento ou diminuição da afinidade da Hb pelo oxigênio; redução da síntese de uma cadeia da globina, resultando em uma das formas de talassemia (Naoum, 1997).

A maioria das Hbs variantes incomuns, na forma heterozigota, são assintomáticas, entretanto a presença de Hb variante junto com outras hemoglobinopatias e talassemias pode resultar em doença grave (Harteveld *et al.*, 2005; Harteveld *et al.*, 2006; Fucharoen *et al.*, 2007; Harteveld *et al.*, 2007a; Harteveld *et al.*, 2007b; Jorge *et al*., 2012).

Como exemplo de hemoglobinas variantes incomuns que possuem importância clínica e manifestação hematológica, pode-se citar a hemoglobina Leeds em associação com β talassemia que pode causar anemia grave (Williams *et al.*, 2007); Hb Medicine Lake, em associação com a Hb Köln, causa quadro de talassemia grave (Coleman *et al.*, 1995); Hb Cagliari e Hb Rush causam anemia hemolítica (Adams *et al.*, 1974; Podda *et al.*, 1991); Hb Zoeterwoude causa eritrocitose e hipóxia, (Harteveld *et al.*, 2005); Hb Bleuland gera microcitose e hipocromia (Harteveld *et al.*, 2006); Hb Stara Zagora causa anemia hemolítica grave (Petkov *et al.*, 2005). Existem cerca de 100 hemoglobinas variantes relacionadas com aumento da afinidade por oxigênio, o que gera hipóxia e eritrocitose compensatória (Wajcman & Galactéros, 2005; Fucharoen *et al.*, 2007).

As hemoglobinas variantes são geralmente detectadas quando o paciente apresenta hipocromia, microcitose, hipóxia, eritrocitose ou parâmetros hematológicos alterados que não podem ser explicados por deficiência de ferro e/ou talassemia (Harteveld *et al.*, 2005; Harteveld *et al.*, 2006; ; Harteveld *et al.*, 2007a; Harteveld *et al.*, 2007b). Há casos em que são detectadas em doador de sangue (Jorge *et al.*, 2007), quando é realizado aconselhamento genético ou em casos de investigação de hepatoesplenomegalia (Lacan *et al.*, 2004). Há também casos em que é feito um diagnóstico de hemoglobina S, mas a porcentagem relativa das hemoglobinas presentes não corresponde ao que habitualmente é esperado. Quando a Hb é analisada por outros métodos, descobre-se, então, uma variante desconhecida (Fucharoen *et al.*, 2007).

No Brasil já foram descritas novas variantes, tais como Hb Itapira, Hb Bom Jesus da Lapa, Hb Boa Esperança (Jorge *et al*., 2007), Hb S-São Paulo (Jorge *et al*., 2012), entre outras, e há significativa possibilidade de que novas variantes sejam identificadas, uma vez que o Brasil possui grande miscigenação genética resultante da mistura de Ameríndios, Europeus e Africanos (Pimenta *et al*., 2006).

Pesquisadores de vários centros criaram um banco de dados sobre Hbs variantes chamado Hbvar localizado dentro do *Globin Gene Server* disponível no endereço eletrônico http://globin.cse.pse.edu/globin/hbvar/menu.html. Nesse banco são encontradas diversas informações sobre cada variante, incluindo a descrição da

mutação, manifestações clínicas associadas, dados laboratoriais, ocorrência étnica, além de referências bibliográficas. (Hardison *et al.*, 2002). Há também ferramentas de notação genômica e alinhamento que podem ser utilizadas, além de protocolos disponíveis para o diagnóstico (Patrinos *et al.*, 2004; Giardine *et al.*, 2007).

3.4- DOENÇA FALCIFORME

As doenças falciformes são caracterizadas pela presença da hemoglobina S (Hb S) nos eritrócitos (Weatherall & Clegg, 2001). Os indivíduos heterozigotos para a Hb S (Hb AS), também chamados de portadores do traço falciforme, são clinicamente assintomáticos. Já os indivíduos homozigotos (Hb SS) apresentam uma anemia hemolítica crônica conhecida como anemia falciforme. As consequências do intenso processo de falcização nesses indivíduos são variáveis e dependem de vários fatores, entre eles da quantidade de Hb F residual que eles possuem (Tomé-Alves *et al.*, 2000). Os pacientes comumente apresentam uma anemia hemolítica crônica acompanhada da oclusão de pequenos vasos sanguíneos, o que leva a lesão tecidual isquêmica, dor, infartamento e necrose de diversos órgãos (Clarke & Higgins, 2000).

A Hb S é a variante mais comum na população brasileira. A incidência da doença falciforme na triagem neonatal de MG é 1:1.313 e traço falciforme 1:30 (Fernandes *et al.*, 2010). Existem dezenas de Hbs que apresentam perfil cromatográfico e/ou eletroforético similar ao da Hb S o que pode levar a falso diagnóstico de doença falciforme se não forem devidamente confirmadas (Chinelato-Fernandes & Bonini-Domingos, 2005).

3.5- HEMOGLOBINA STANLEYVILLE-II

A Hb Stanleyville-II é uma variante de cadeia alfa [alpha2 or alpha1 78(EF7) Asp>Lis *HBA2*:c.237C>G (or *HBA1*)] na qual há substituição do aminoácido asparagina por lisina, no códon 78 na região não-helicoidal entre as hélices E e F (EF7). Essa Hb foi descrita pela primeira vez em 1959, em duas famílias do nordeste do Congo, fronteira do Sudão, em Stanleyville, hoje chamada Kisangani, cidade pertencente à República Democrática de Congo. Uma das famílias pertencia à tribo Budu, de língua Bantu, vivia no nordeste do Congo Belga e era rodeada por tribo Nilotes. A outra família era oriunda do nordeste de Congo, na região do rio Uele, cuja população é

originada de uma mistura das tribos Bantu-Nilote. A descoberta da Hb Stanleyville-II se deu pelo estudo do sangue de quatro indivíduos, sendo a mãe e um filho de cada família. A eletroforese no gel de amido em pH alcalino mostrou além da hemoglobina A, uma outra fração indistinguível das hemoglobinas Hb S e D. Essas frações foram indistinguíveis da Hb A pela eletroforese em pH ácido. O teste de falcização foi negativo e a Hb variante foi denominada Stanleyville-II (Dherte *et al.*, 1959).

Posteriormente foi descrito um novo caso de Hb Stanleyville-II, também em heterozigose, em uma mulher da república do Congo. A Hb apresentou as mesmas características na eletroforese alcalina e ácida. Foi possível visualizar uma fração de Hb A_2, mais lenta que a A_2 tradicional, provavelmente composta de cadeia alfa com a mutação Stanleyville-II associada à cadeia δ normal. O estudo identificou ainda, no códon 78 da cadeia alfa, através da técnica de *fingerprint*, a substituição da asparagina pela lisina. Como essa substituição ocorre em uma região não-helicoidal entre as hélices E e F (EF7), na superfície da molécula da hemoglobina, sem contato com o grupo heme ou com outra cadeia de globina, os autores previram, acertadamente, que a hemoglobina variante não traria consequências clínicas (Van Ros *et al.*, 1968).

North e colaboradores (1975) descreveram a Hb Stanleyville-II em heterozigose em uma família que vivia na Alsácia, região da França. As características eletroforéticas não se distinguiam do que já foi até aqui referido. A fração representava 24% da hemoglobina total na menina de 8 anos. A mãe e cinco dos sete irmãos da criança também eram portadores da Hb variante. Pelo método de *fingerprint* verificou-se a troca da asparagina pela lisina, no códon 78 (EF7) da cadeia alfa.

Costa e colaboradores (1987) descreveram o estudo de duas famílias brasileiras com Hb Stanleyville-II associada à α-talassemia. Um dos pacientes foi o primeiro caso descrito de homozigose tanto para Hb Stanleyville-II como para Hb S. Tratava-se de uma menina brasileira, de quatro anos de idade, negra, apresentando quadro clínico compatível com doença falciforme, além de microcitose e hipocromia. O teste de falcização foi positivo, inclusive nos pais. A eletroforese em acetato de celulose, pH alcalino, mostrou uma banda de Hb F ($\alpha_2^{Sta}\gamma_2$), uma banda da Hb híbrida S/Sta II, migrando na região da Hb A_2, e uma banda da Hb A_2 variante ($\alpha_2^{Sta}\delta_2$) ainda mais lenta que a Hb A_2 habitual. Já a eletroforese dos pais mostrou quatro frações de hemoglobina, migrando nas posições da Hb A, da Hb S, da Hb A_2 habitual e uma fração ainda mais lenta que esta. O padrão eletroforético em pH ácido mostrou Hb S em homozigose para a criança e em heterozigose para os seus pais.

Dodé e colaboradores, (1990) por meio de técnicas moleculares para análise das mutações no gene daa alfa globina humana, estudaram o DNA de um indivíduo negro, do Zaire (atual República Democrática de Congo), e demonstraram homozigose para anemia falciforme em associação com Hb Stanleyville-II, na ausência de alfa talassemia. Os genes α1 e α2 foram sequenciados e verificou-se que a mutação envolvia o éxon 2 do gene α2: AAC > AAA (Stanleyville-II, α_2^{78Lys}).

A análise dos aminoácidos de cada uma das cadeias de globina pelo *fingerprint* mostrou na cadeia alfa a substituição da asparagina pela lisina (α78 Asn>Lys), confirmando a Hb Stanleyville-II, e, na cadeia beta, a substituição do ácido glutâmico pela valina (Glu>Val), confirmando a dupla homozigose Hb S/StaII na criança ($\alpha_2^{Sta}\beta_2^{S}$). A quantificação da síntese das cadeias de globina mostrou que a razão entre a produção de cadeias alfa/não-alfa variou entre 0,59 a 0,77 nos diversos indivíduos estudados, confirmando a hipótese de alfa talassemia. Como não foram encontradas cadeias α ou β normais no paciente estudado, os autores concluíram que a dupla homozigose para as duas variantes só seria possível na associação da α talassemia em cis com a α Stanleyville-II. Isso foi demonstrado no trabalho subsequente (Costa *et al.*, 1991), usando enzimas de restrição que definiram o estado de heterozigose para a deleção do tipo 3.7 nos pais e na irmã e de homozigose no paciente estudado.

Costa e colaboradores (1991) encontraram a Hb Stanleyville-II em uma mulher de 20 anos, brasileira, negra. Essa Hb constituía 35% do total das cadeias alfa produzidas e, pelo mesmo raciocínio acima, a mutação deveria estar em cis com a deleção de um gene alfa.

Wenning e colaboradores (2000) analisaram 27 pacientes com hemoglobinopatias estruturais de cadeia alfa, sendo quatro deles (3 negros e um caucasiano) heterozigotos para a Hb Stanleyville-II em associação com a talassemia $\alpha^{3.7}$ ($-\alpha^{Stanleyville}$) e sem co-herança da Hb S. Eles apresentavam microcitose e hipocromia, provavelmente devidas à associação com a α-talassemia. O padrão eletroforético foi similar ao já descrito. Os autores afirmaram que a substituição nucleotídica AAC > AAA foi confirmada por sequenciamento de DNA e estaria presente no gene *HBA1*.

Serjeant e colaboradores (2005), como parte do estudo de 100 pacientes com doença falciforme em Uganda, identificaram, em dois deles, um padrão eletroforético compatível com hemoglobinopatia SC. Uma investigação mais detalhada mostrou tratar-se de hemoglobina S em homozigose associada com Hb Stanleyville-II em

heterozigose. A fração que se assemelhava à Hb C, na verdade, era a hemoglobina híbrida $\alpha_2^{Sta}\beta_2^{S}$.

A Hb Stanleyville-II foi encontrada em heterozigose em um paciente alemão diabético o qual teve a dosagem de Hb glicosilada superestimada pelo HPLC devido à presença dessa Hb. Os autores destacaram a limitação da quantificação da glicemia pelo HPLC quando há uma Hb variante associada à Hb A, pois existem algumas variantes que influenciam essa quantificação (Ostendorf *et al.*, 2005).

Em estudo realizado no Quênia foi encontrada a Hb Stanleyville-II em heterozigose em uma criança de um ano com parâmetros hematológicos normais e sem alfa-talassemia. Os autores destacam que o diagnóstico diferencial entre essa Hb e a Hb G-Philadelphia por meio de HPLC é confuso, uma vez que ambas geram padrões cromatográficos muito semelhantes (Waitumbi *et al.*, 2007).

González e colaboradores (2008) descreveram o primeiro caso da Hb Stanleyville-II na Espanha, sendo este o segundo caso em uma pessoa não-negra na literatura médica. O estudo mostrou que, pela eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino e pela focalização isoelétrica, a Hb variante se comportava de forma semelhante à hemoglobina S. No entanto, a mesma não se separava da Hb A pela eletroforese em pH ácido. O estudo do gene da cadeia alfa por meio de sequenciamento gênico mostrou a mutação AA<u>C</u> > AA<u>A</u>, em heterozigose, no códon 78 do segundo éxon da gene $\alpha 2$. No mesmo estudo foi comprovado que a troca de um aminoácido eletricamente neutro (asparagina) por outro aminoácido eletricamente positivo (lisina) na superfície externa da estrutura terciária da cadeia da globina, no segmento EF, provoca apenas uma variação na carga da cadeia. A localização da mutação não interfere na estabilidade, solubilidade ou afinidade pelo oxigênio do tetrâmero da globina, justificando a ausência de manifestações clínicas (Gonzalez *et al.*, 2008).

Moradkhani e colaboradores (2009) realizaram estudo por meio de HPLC, IEF e sequenciamento de DNA e encontraram dois casos de Stanleyville-II em heterozigose no gene alfa2 (237C>A) e 3 casos no gene híbrido alfa talassêmico (237C>G). Esse é o único estudo que relatou a transversão de C por G na posição 237 do gene.

Em estudo realizado no Rio Grande do Sul com 437.787 neonatos triados, foram encontrados doze casos de Hb Stanleyville-II em heterozigose pelo sequenciamento dos genes alfa 1 e 2. Nesse estudo a presença de alfa-talassemia e a relação de parentesco não foram avaliadas (Wagner *et al.*, 2010).

Em estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa foram encontrados dois casos de dupla homozigose para a Hb Stanleyville-II e alfa-talassemia do tipo 3.7. A IEF ao nascimento de ambas as crianças evidenciou apenas duas bandas: uma com corrida eletroforética na região da Hb S e outra localizada entre S e C. Já os perfis eletroforéticos no sexto mês de vida e nas amostras de confirmação das duas crianças evidenciaram homozigose para hemoglobina na região da Hb S. Os perfis eletroforéticos dos pais das crianças foram compatíveis com traço para hemoglobina variante na região da Hb S. Em ambos casos as crianças apresentavam microcitose e hipocromia devido, provavelmente, à presença da alfa-talassemia (Pimentel *et al.,* 2011)

Lin e colaboradores (2011) encontraram a Hb Stanleyville-II em associação com a Hb Constant Spring, sem associação com a alfa-talassemia, em uma mulher chinesa. A concentração de Hb era de 6,6 g/dL, o HCM de 58 fL e o HCM de 16,6 pg. As Hbs foram estudadas por meio de HPLC e eletroforese em ágar e os genes alfa foram sequenciados. Segundo os autores, a mutação da Hb Stanleyville-II (AAC>AAA) foi encontrada no gene alfa 1 e a da Hb Constant Spring no gene alfa 2. Esse foi o primeiro caso descrito de Hb Stanleyville-II na Ásia e os autores hipotetizaram que a mutação que resulta na Hb Stanleyville-II teria três origens diferentes: uma na África, em geral associada à alfa talassemia do tipo 3.7, outra européia no gene alfa 2 e outra asiática, no gene alfa 1.

3.5.1- ASSOCIAÇÃO DA HB STANLEYVILLE-II COM OUTRAS HEMOGLOBINOPATIAS

A hemoglobina Stanleyville-II foi observada em associação com a anemia falciforme (Serjeant *et al.,* 2005; Burchall & Maxwell, 2010), com a talassemia $\alpha^{-3.7}$ (Costa *et al.,* 1987; Costa *et al.,* 1991; Serjeant *et al.,* 2005; Kimura *et al.,* 2008), com o traço para a anemia falciforme (Rhoda *et al.,* 1983; Costa *et al.,* 1987); (Wenning *et al.,* 2000; Serjeant *et al.,* 2005); (Kimura *et al.,* 2008);(Burchall & Maxwell, 2010), com a Hb Campinas (Kimura *et al.,* 2008) e com a Hb Constant Spring (Lin *et al.,* 2011).

Há evidências laboratoriais de que a mutação α_2^{78} interferiria nas relações intermoleculares quando a Hb Stanleyville-II se combina com Hb S ($\alpha_2^{78\ Asn>Lys}\beta_2^{6\ Glu>Val}$). Haveria estabilização da formação de fibras, modificando as propriedades das formas oxi e deoxi da variante falciforme, levando à diminuição da polimerização da

hemoglobina e consequentemente a um achado clínico semelhante à Hb S no estado de heterozigose (North *et al.,* 1980; Rhoda *et al.,* 1983).

Costa e colaboradores (1987), como já descrito, descreveram a Hb Stanleyville-II em associação com o alelo β^S e com alfa-talassemia em homozigose e não encontraram vantagens clínicas, uma vez que os dados hematológicos e a evolução clínica dos heterozigotos compostos foram indistinguíveis de pacientes que apresentavam a forma grave de anemia falciforme.

Burchall e Maxwell (2010) descreveram um caso de associação da Hb Stanleyville II com a Hb S e alfa-talassemia e observaram que essa associação modificaria o fenótipo da anemia falciforme, diminuindo a gravidade do quadro clínico do paciente. Eles afirmam que essa associação teria papel inibitório na formação de fibras de Hb, o que geraria redução da tendência à polimerização e aumento no mecanismo da estabilidade. Os autores também afirmam que a associação da Hb Stanleyville-II tão somente com a beta ou alfa-talassemia parece não conferir vantagem clínica para o paciente.

A associação da alfa talassemia com a anemia falciforme tem sido considerada como fator de bom prognóstico para os pacientes. Belisário e colaboradores (2010) estudaram a influência da alfa talassemia nas manifestações clínicas e laboratoriais da anemia falciforme e encontraram valores de leucócitos, reticulócitos, VCM e HCM reduzidos. Além disso, foi encontrada uma diminuição significativa no risco de doença cerebrovascular. Portanto, a mudança no fenótipo da anemia falciforme encontrada por Burchall e Maxwell (2010) pode ser devida à associação com a alfa talassemia e não com a Hb Stanleyville-II.

3.6- HEMOGLOBINA HASHARON

A Hb Hasharon também conhecida como L-Ferrara, Michigan-I, Michigan-II, Sealy e Sinai é variante de cadeia alfa [alpha2 or alpha1 47(CE5) Asp>His *HBA2*:c.142G>C (or *HBA1*)], na qual ocorre a substituição de ácido aspártico por histidina no códon 47. Ela foi descrita por Halbrecht e colaboradores (1967) em um indivíduo heterozigoto sem alterações hematológicas. Os autores encontraram a Hb com comportamento eletroforético semelhante ao da Hb S em uma judia Ashkenazi.

A Hb Sealy foi descrita por Scheneider e colaboradores (1968) em uma família judia sem alterações clínicas e hematológicas. A Hb Sinai foi descrita por Ostertag e

Smith (1968) em uma família de descendentes judeus. Nesse último estudo não foram avaliados os parâmetros hematológicos.

No Canadá foram pesquisadas as Hbs variantes em 228.300 doadores de sangue e foram encontrados quatro casos de Hb Hasharon em uma família judaica. A associação com alfa talassemia e a relevência clínica não foram avaliadas (Vella et al., 1975).

O estudo molecular da Hb foi realizado por Molchanova e colaboradores (1994) os quais relataram três casos de Hb Hasharon em heterozigose. Segundo esses autores, a Hb possui instabilidade média e está localizada no gene alfa 2.

Em estudo realizado no Brasil foram relatados 15 casos de Hb Hasharon em associação com a Hb A em descendentes de italianos, dentre 27 estudados que apresentavam alterações estruturais na Hb; todas as 15, em associação com a alfa talassemia do tipo 3.7 (Wenning *et al.,* 2000).

Em estudo realizado com 220 pessoas com suspeita de serem portadoras de Hbs variantes provenientes de oito estados do Brasil foram encontrados 11 casos de Hb Hasharon em heterozigose com a Hb A. A maioria dessas pessoas residiam no estado de São Paulo o que indicaria a influência de italianos na formação da população paulista, uma vez que a essa Hb é encontrada em italianos e judeus Ashkenazi (Chinelato-Fernandes & Bonini-Domingos, 2005).

Chinelato-Fernandes e colaboradores (2006) utilizaram-se de várias técnicas laboratoriais para tentar identificar hemoglobina variante com perfil eletroforético semelhante ao da Hb S em 10 pacientes. Estabeleceram PCR-RFLP com enzima TaqI que permite identificar a mutação que codifica a Hb Hasharon. Em nove pessoas foi este o diagnóstico final e em uma não foi possível amplificar o DNA.

A Hb Hasharon foi encontrada em associação com a Hb Rio Claro e alfa talassemia. O paciente apresentou alterações hematológicas relacionadas à alfa talassemia (Kimura *et al.,* 2008).

Moradkhani e colaboradores (2009) encontraram três casos de Hb Hasharon em heterozigose, dois no gene *HBA1* (um judeu brasileiro e um inglês) e um no gene *HBA2* (judeu ingles), todas sem associação com a alfa talassemia. Esse é o único trabalho que encontrou a mutação no gene *HBA1*. Os dados hematológicos das três pessoas estavam dentro da normalidade e a Hb foi considerada estável.

Em estudo no qual foi pesquisada a causa de anemia leve em 2.020 pessoas da América Latina, foi encontrado fenótipo alterado de Hb, inclusive talassemias, em

75,5% dos casos. Entre as 70 variantes estruturais “raras” encontradas (3,5%), 10 (14,3%) foram caracterizadas como Hb Hasharon em heterozigose e duas como Hb Stanleyville-II. A Hb Hasharon seria originária do Mediterrâneo, o que confirma a intensa influência europeia na composição da população da América Latina (Zamaro & Bonini-Domingos, 2010) .

Em estudo realizado no Rio Grande do Sul com 437.787 crianças triadas foram encontrados três casos da Hb Hasharon em heterozigose no gene alfa 2. A presença de alfa talassemia não foi avaliada (Wagner *et al.*, 2010).

3.7- HEMOGLOBINA OTTAWA (OU SIAM)

A Hb Ottawa é variante de cadeia alfa [(alpha1 15(A13) Gly>Arg *HBA1*:c.46G>C] na qual há mudança de uma glicina por uma arginina no códon 15 do gene alfa1, posição A13 da molécula. Ela foi descrita em heterozigose em 1974 em um canadense que tinha anemia leve, aparentemente não relacionada à Hb Ottawa (Vella *et al.*, 1974). Ainda no ano de 1974 foi encontrada a mesma mutação em associação com a Hb A em um tailandês de ancestralidade chinesa, tendo sido essa Hb denominada Siam devido ao não conhecimento da descrição já feita por Vella e colaboradores (1974). Não foram encontradas alterações clínicas e hematológicas (Pootrakul *et al.*, 1974).

O primeiro estudo molecular com a Hb Ottawa foi realizado por Yodsowan e colaboradores (2000) em tailandesa que apresentava microcitose, hipocromia e células em alvo, provavelmente secundárias à associação com alfa talassemia delecional do tipo 1 que ela apresentava. Na IEF a Hb tinha mobilidade eletroforética na posição da Hb S e o estudo molecular localizou a mutação no gene *HBA1*.

Em estudo posterior foi encontrada a Hb Ottawa em uma paciente com anemia leve, dosagem de Hb A_2 aumentada (5,5%) e beta talassemia associada. O pai e a irmã também apresentavam a Hb; o pai tinha parâmetros hematológicos normais e a irmã apresentava apenas leve anemia. Todos os casos ocorreram em associação com a Hb A. Nesse estudo foi comprovado, portanto, que a Hb Ottawa não possui efeito talassêmico na produção da cadeia globínica (Turbpaiboon *et al.*, 2002).

Fucharoen e colaboradores (2007) desenvolveram uma PCR alelo-específica multiplex para detectar as Hbs Queens e Siam, que haviam sido confundidas com a Hb S por apresentarem ponto isoelétrico semelhante, em duas gestantes com anemia leve.

Os autores destacam a importância de técnicas adicionais para distinguir as Hbs que são confundidas com a Hb S.

Shih e colaboradores (2010) realizaram estudo com o objetivo de desenvolver técnica que permitisse a identificação de Hb variantes de cadeia alfa e a definição do gene (*HBA1 ou HBA2*) no qual a mutação está presente. Eles estabeleceram uma técnica chamada *high-resolution melting* a qual permitiu a identificação de várias Hbs, dentro essas, a Hb Ottawa.

Em estudo realizado em 11.450 pessoas saudáveis em Guangdong (China) com o objetivo de verificar o perfil epidemiológico das Hb variantes, foram encontrados quatro casos de Hb Ottawa em heterozigose (Lin *et al.,* 2012).
Em todos os casos nos quais houve demonstração molecular, a mutação gênica foi localizada no gene *HBA1*.

3.8- HEMOGLOBINA MAPUTO

A Hb Maputo é variante estável de cadeia beta primeiramente descrita por Marinucci e colaboradores *(*1983) em uma criança de dois anos nascida em Maputo, Moçambique. Essa Hb ocorre pela substituição de ácido aspártico por tirosina no códon 47, localizado na superfície externa da molécula (CD6). A criança descrita tinha associação com a HbS, apresentava quadro de anemia moderada a grave (Hb 8,5 g/dL), baço palpável a 3 cm do rebordo costal, anisocitose e células em alvo. Além disso, a concetração de hemoglobina A_2 estava levemente aumentada. O nível de hemoglobina F estava dentro do limite normal. Na eletroforese alcalina foi visualizada apenas uma banda na posição de S e na eletroforese ácida, foram observadas duas bandas: uma na posição da Hb S e outra na posição da Hb A. Os pais da criança não apresentavam alterações clínicas e hematológicas, sendo o pai portador do traço falciforme e a mãe de Hb variante não identificada associada à Hb A. Não foi possível nesse estudo fazer avaliações funcionais que atribuíssem as alterações clínicas observadas à Hb Maputo ou à associação da Hb Maputo com a Hb S (Marinucci *et al.,* 1983).

A hemoglobina Maputo, assim como outras variantes globínicas com mutação na posição 47 do gene *HBB* (Hb Gavello, Hb G Copenhagen e Hb Avicenna), parece não ter estabilidade alterada, pois a sua afinidade de ligação ao oxigênio e seus efeitos de cooperatividade são normais (Marinucci *et al.,* 1983).

Posteriormente foi encontrada a Hb Maputo em heterozigose com a Hb A em um paciente caucasiano dos Estados Unidos, sem alterações clínicas ou hematológicas. O perfil eletroforético foi semelhante ao encontrado por Marinucci e colaboradores (1983) na mãe da criança já relatada. A Hb A_2 representava 2,9% do total e não foi encontrada alteração no equilíbrio de oxigênio nessa Hb (Moo-Penn *et al.*, 1991).

Pesquisa realizada no PubMed em abril de 2012 não revelou qualquer outro caso na literatura internacional. Ainda não existe evidência experimental do tipo de mutação gênica que dá origem à Hb Maputo.

3.9- HEMOGLOBINA G-FERRARA

A Hb G-Ferrara é variante levemente instável, de cadeia beta. Nela ocorre a substituição do aminoácido asparagina pela lisina no códon 57, posição externa da molécula. Ela apresenta, em relação à Hb A, taxa mais elevada de dissociação em dímeros e alteração no efeito de ligação do oxigênio pelo difosfoglicerato. Isso pode ser devido à introdução de carga positiva extra na região da troca de aminoácidos. Isso explicaria o aumento do efeito Bohr presente nessa Hb (Giardina *et al.*, 1978).

Essa Hb foi descrita em famílias italianas e os portadores foram considerados hematologicamente normais, apesar de a Hb ter sido considerada instável em estudos feitos *in vitro* (Giardina *et al*, 1978; Guerrasio *et al.*, 1979). Os autores relatam que, na mesma região da Itália, haviam sido observados outros casos semelhantes, não publicados ou publicados em revistas às quais não se conseguiu acesso.

Associação da Hb G Ferrara com a Hb S foi observada em criança de Moçambique por Canizares e colaboradores (1983). Ela apresentava ovalócitos, microcitose, poiquilocitose, anisocitose, células em alvo, drepanócitos, hematócrito 27%, Hb 8,4 g/dL, reticulócitos 8% e ferro sérico 77 µg/dL. Os dados indicam que a Hb G-Ferrara favoreceria a polimerização da hemoglobina S. A eletroforese alcalina mostrou na paciente uma única banda na posição da Hb S; no pai uma banda na posição de Hb A e uma na posição da Hb S, com teste de falcização positivo. Na mãe constatou-se o mesmo padrão do pai, entretanto o teste de falcização era negativo, demonstrando que, em pH básico, a hemoglobina G-Ferrara tem mobilidade semelhante à da Hb S.

Pesquisa realizada no PubMed em abril de 2012 não revelou qualquer outro caso na literatura internacional. Ainda não existe evidência experimental do tipo de mutação gênica que dá origem à Hb G-Ferrara.

3.10- HEMOGLOBINA ST LUKE'S

A Hb St Luke's é variante de cadeia alfa [alpha1 95(G2) Pro>Arg *HBA1*:c.287C>G] com padrão migratório semelhante ao da Hb S na qual há substituição de prolina por arginina no códon 95, posição G2, no contato das cadeias alfa e beta ($\alpha_1\beta_2$). Essa Hb foi descrita em heterozigose em uma família maltesa cujos parâmetros clínicos e hematológicos eram normais. Estudos bioquímicos iniciais mostraram que essa Hb possuiria leve diminuição na interação do grupo heme e afinidade ao oxigênio reduzida (Bannister *et al.*, 1972).

Em outro estudo essa Hb foi encontrada associada à Hb A em um homem, também da ilha de Malta, com policitemia, dedo do pé amputado, fumante inveterado e com diabete melito. Estudos bioquímicos mostraram que essa Hb teria afinidade ao oxigênio aumentada (2,5 vezes mais em relação à Hb A no pH 7,4), interação heme reduzida e efeito Bohr levemente reduzido (Lorkin *et al.*, 1974). O dado de afinidade ao oxigênio difere do encontrado por Bannister e colaboradores (1972) devido ao fato deste grupo ter usado uma amostra com alta concentração de metemoglobina.

Felice e colaboradores (1981) encontraram 12 casos heterozigotos dessa Hb em malteses com dados hematológicos normais e observaram quantidade de Hb St Luke's bem abaixo do esperado (12%). Eles atribuíram essa diminuição a um defeito no momento da montagem da proteína e a uma tendência mais acentuada a formar dímeros devido à mudança de aminoácido ser no contato das cadeias alfa e beta.

A Hb St Luke's foi observada no Japão em uma senhora com colecistite aguda. Ela apresentava dados hematológicos normais e uma concentração da Hb variante de 13%. Foram feitos estudos bioquímicos e encontrados um aumento da afinidade pelo oxigênio, efeito Bohr levemente diminuído, dados comparáveis aos relatados por Lorkin e colaboradores (1974). Entretanto a interação com 2,3-DPG foi considerada normal (Harano *et al.*, 1983).

O primeiro estudo molecular da Hb St Luke's foi feito por Molchanova e colaboradores (1994) que provaram ser a mutação que codifica essa Hb exclusiva do gene *HBA1*. Nesse estudo a Hb St Luke's foi considerada instável por meio de testes de estabilidade térmica e teste de n-butanol.

Wettinger e colaboradores (1999) estudaram 23.000 malteses e encontraram 40 indivíduos com Hb St Luke's associados à Hb A. A média da concentração dessa Hb foi de 11,1% do total e os parâmetros hematológicos foram normais, com exceção de uma

mulher que apresentou microcitose e hipocromia, devido a associação com beta talassemia heterozigótica. Em todos os casos examinados a mutação ocorreu no gene *HBA1*.

3.11- HEMOGLOBINA ETOBICOKE

A Hb Etobicoke é variante de cadeia alfa descrita em uma família canadense com ancestralidade irlandesa. A mutação ocorre no códon 84 (F5) pela qual serina é substituída por arginina na parte interna da molécula. No primeiro caso descrito foi encontrada uma concentração de Hb variante de 15% na posição de S ou D e não foram observadas alterações hematológicas. Algum tipo de alteração era esperada devido à localização molecular da mudança de aminoácido (Crookston *et al.,* 1969).

Em estudo realizado no Japão essa Hb foi encontrada associada à Hb A em um homem com leve reticulocitose, sem consequências clínicas. Estudos bioquímicos mostraram que essa Hb é instável e possui afinidade aumentada pelo oxigênio (Harano *et al.,* 1982).

Estudo posterior realizado nos Estados Unidos em criança com cinco semanas de idade descendente de francês, índios Cherokees e inglês foi encontrada a Hb Etobicoke na posição de Hb G e em proporção de 16% do total. A razão para a concentração baixa de hemoglobina total (8,9 g/dL) não foi investigada (Headlee *et al.,* 1983).

O'Brien e colaboradores (2003) encontraram a Hb Etobicoke em heterozigose em paciente irlandês diabético. Destacou-se a importância do conhecimento sobre a presença de hemoglobinas variantes para a quantificação da glicemia através da Hb glicosilada, pois existem algumas variantes que influenciam essa quantificação. Os autores destacam que essa Hb foi diagnosticada como uma variante na área de retenção da Hb D pelo HPLC e na posição de S pela IEF.

Pesquisa realizada no PubMed em abril de 2012 não revelou qualquer outro caso na literatura internacional. Ainda não existe evidência experimental do tipo de mutação gênica que dá origem à Hb Etobicoke.

3.12- HEMOGLOBINA RUSH

A Hb Rush é uma variante instável gerada por mutação na posição 304 do gene β (G>C) no códon 101, que ocasiona a substituição de ácido glutâmico, localizado na

região da cavidade central da hemoglobina (G3), por glutamina. Ela foi descrita, associada à Hb A, em 1974 por Adams e colaboradores em uma mulher negra de 43 anos que apresentou anemia hemolítica leve após colecistectomia, anisocitose, poiquilocitose, células em alvo, ponteado basófilo, siderócitos e sideroblastos. Além disso, houve queda no nível de hemoglobina de 12 para 10,3 g/dL, o hematócrito diminuiu de 37% para 29,8% e a contagem de reticulócitos aumentou de 2 para 4% no quarto dia após a cirurgia. A mesma hemoglobina foi detectada em uma filha e uma neta. Só existe essa família descrita na literatura internacional. Outras citações referem-se a estudos bioquímicos baseados em amostras dessas pessoas (Frischer & Bowman, 1975; Shih *et al*., 1985).

Frisher e Bowman (1975) avaliaram a deficiência da enzima eritrocítica glutationa redutase, utilizando a redução visível de 2,6-diclorofenol inositol (DCIP) pela glutationa e observaram que a Hb Rush não é precipitada por DCIP, o que indica a ausência de deficiência da enzima eritrocítica glutationa redutase.

Shih e colaboradores (1985) estudaram as Hbs Bristish, Rush, Columbia, Potomac e Alberta, que possuem diferentes mutações no códon 101 do gene beta, para elucidar o papel do ácido glutâmico na ligação da Hb ao oxigênio, uma vez que este está localizado no contato da subunidade $\alpha_1\beta_2$ da Hb A, que é essencial para a propriedade de ligação de O_2. Eles evidenciaram que a Hb Rush possui função normal em relação à afinidade pelo oxigênio. Adams e colaboradores (1974) demonstraram que a Hb Rush possui uma curva de dissociação de oxigênio normal.

A tabela 1 resume os dados das Hbs citadas ao longo da revisão da literatura.

Tabela 1- Hemoglobinas variantes citadas na revisão da literatura, com as respectivas alterações genética e apresentação clínica

Hemoglobina	Gene	Alteração genética	Códon	Apresentação clínica em heterozigose	Referência
Etobicoke	α2	AGC>AGG	84	Normal	*Globin gene server*
G-Ferrara	β	AAC>AAA	57	Normal	Guerrasio *et al.*, 1979; Giardina *et al*, 1978
Hasharon	α1 ou α2	GAC>CAC	47	Normal	*Globin gene server*
Maputo	β	GAT>TAT	47	Normal	*Globin gene server*
Ottawa	α1	GGT>CGT	15	Normal	*Globin gene server*
Rush	β	GAG>CAG	101	Anemia hemolítica média	*Globin gene server*
Stanleyville-II	α1 ou α2	AAC>AAG	78	Normal	*Globin gene server*
St Luke's	α1	CCG>CGG	95	Normal	*Globin gene server*

3.13- ALFA TALASSEMIA

A alfa talassemia constitui um grupo de doenças hereditárias de distribuição mundial causada pela deficiência de síntese de uma ou mais cadeias alfa da Hb (Cançado, 2006). É a doença monogênica mais comum sendo mais prevalente em áreas tropicais. Devido à migração populacional, também tem sido encontrada em países não tropicais (Higgs *et al.*, 1989; Weatherall & Clegg, 2001).

A alfa talassemia é mais frequentemente causada por deleções envolvendo um ou ambos os genes alfa, mas também pode ser causada por mutações pontuais ou inserções de nucleotídeos envolvendo as sequências que regulam a expressão do gene alfa (Higgs *et al.*, 1989).

No caso de alteração delecional as α-talassemias são caracterizadas de acordo com o número de genes afetados, podendo atingir de um a quatro genes da α globina. No portador silencioso (ou talassemia alfa mínima), ocorre a deleção de apenas um gene *HBA* (-α/αα); no traço alfa talassêmico (ou talassemia alfa menor), há a deleção de dois genes *HBA* (-α/-α ou --/αα); na doença da Hb H (ou talassemia alfa intermédia), 3 genes *HBA* são deletados (--/ -α) e na Síndrome da Hidropsia Fetal há deleção dos 4 genes (--/--). A alfa-talassemia mínima é a mais comum e é praticamente assintomática e com alterações laboratoriais mínimas (leve microcitose e hipocromia) ou inexistentes o que dificulta o diagnóstico laboratorial (Naoum, 1997; Cançado, 2006).

O grupo dos genes da α globina está localizado no braço curto do cromossomo 16 e estão arranjados na posição 5´→3´ conforme a expressão durante a ontogênese (figura 6). Apesar dos genes *HBA1* e *HBA2* terem grande homologia e codificarem exatamente a mesma cadeia de aminoácidos, a expressão do gene *HBA2* é de duas a três

vezes maior do que a expressão do gene *HBA1*. Ambos os genes são expressos durante o período embrionário, fetal e na vida adulta (Higgs *et al*., 1989).

A figura 3 mostra que os genes *HBA2* e *HBA1* estão localizados dentro de regiões de homologia, representadas pelas letras X, Y e Z, e que são interrompidas por três regiões curtas e não-homólogas, representados pelos números I, II e III. Recombinações recíprocas entre os segmentos Z, que possuem 3,7 kb, produzem cromossomos com apenas um gene *HBA* chamado de gene híbrido ($-\alpha^{3.7}$) resultando em um tipo de talassemia. As mutações delecionais ocorrem por efeito de *crossing-over* desigual, devido ao desalinhamento entre os cromossomos 16 durante o processo de meiose. O *crossing-over* entre as regiões homólogas Z deleta 3,7 kb de DNA e a deleção do tipo $-\alpha^{4.2}$ resulta de *crossing-over* entre as regiões homólogas X e deleta 4,2 kb de DNA.

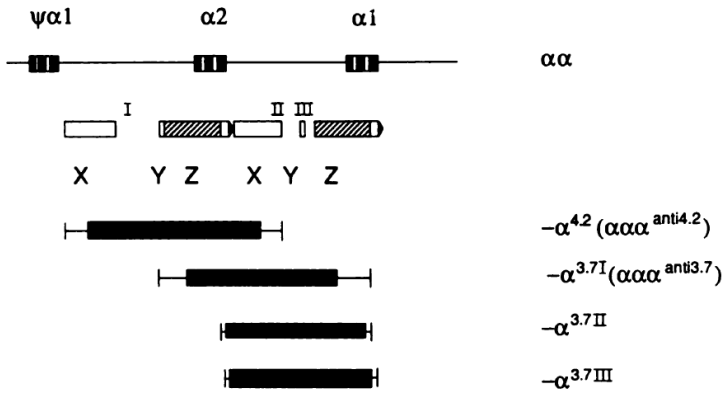


Figura 3- Localização dos genes *HBA2* e *HBA1* no cromossomo 16 e destaque para as regiões homólogas duplicadas (X, Y, Z) e regiões não homológas (I, II e III). A extensão de cada deleção alfa talassêmica é representada pelas caixas sólidas (Higgs *et al*., 1989).

A deleção $-\alpha^{3.7}$ é heterogênea e possui três subtipos diferentes dependendo da localização exata do ponto de quebra da região Z do gene (Higgs *et al*., 1989). Essa deleção é a causa mais comum de alfa-talassemia, sendo mais encontrada na população de origem africana ou mediterrânea. As alterações hematológicas geradas por essa deleção podem ser leves ou ausentes (Borges *et al.*, 2001). .

Em um estudo realizado em Campinas com 339 pacientes que apresentavam

microcitose e hipocromia sem anemia foi encontrada a alfa talassemia em 49,9% dos pacientes, sendo 42,8% do genótipo $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$, 5,3% $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ e 2.5% com mutações não delecionais. Esse dado mostra que a alfa talassemia, em especial a deleção 3.7, é causa comum de microcitose e hipocromia, sem anemia. Essa é uma informação importante, pois muitas vezes o médico pesquisa, sem sucesso, a etiologia dessa alteração hematológica e a trata erroneamente como se fosse deficiência de ferro (Borges *et al.*, 2001).

Vários estudos brasileiros mostram a ocorrência da deleção do tipo 3.7 causando a alfa talassemia. Sonati e colaboradores encontraram a alfa talassemia do tipo 3.7 em 21,3% das 47 pessoas negras estudadas (Sonati *et al.,* 1991). Adorno e colaboradores (2005) estudaram 590 recém-nascidos da Bahia e encontraram a deleção 3.7 em 22,2%. Tomé-Alves e colaboradores (2000) estudaram 1002 portadores de traço falciforme com anemia e encontraram a alfa talassemia em 1,59% (16), o que destaca a importância de avaliar a presença de alfa talassemia em indivíduos AS, após descartar a presença de ferropenia. Couto e colaboradores estudaram a presença da deleção 3.7 em 106 gestantes, 53 com Hb AA e 53 AC. Eles encontraram frequência de 21,7% nas AC e 23% nas AA. Quando comparados os dados hematológicos dos grupos com e sem alfa talassemia, houve diferença estatisticamente significativa o que indica a importância do estudo dessa deleção no acompanhamento das gestantes para evitar complicações à criança e à mãe (Couto *et al.,* 2003). Belisário e colaboradores estudaram a associação da alfa talassemia em 208 crianças SS e 13 $S\beta^0$ e encontraram 27,9% heterozigotas e 1,4% homozigotas para a deleção 3.7 (Belisario *et al.,* 2010).

No Brasil já foram também encontradas, com menor frequência, as deleções $-\alpha^{4.2}$, frequente na população Asiática e do Mediterrâneo, $-\alpha^{MED}$ e $-\alpha^{20.5}$, que causam talassemia α^0 na população mediterrânea (Wenning *et al.*, 2000; Borges *et al.*, 2001; Belisario *et al.,* 2010).

A alfa talassemia é encontrada em associação com várias Hbs variantes (Higgs *et al.,* 1989), havendo vários indícios de melhora no quadro clínico dos pacientes, especialmente quando em associação com o alelo β^S em homozigose (Higgs *et al.,* 1982; Tomé-Alves *et al.,* 2000; Serjeant *et al.,* 2005; Belisario *et al.,* 2010; Burchall & Maxwell, 2010). Existem também hemoglobinas variantes que geram fenótipo talassêmico, como por exemplo a Hb E e a Hb Knossos, entre outras (Higgs *et al.,* 1989).

4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

Adams, J. G., 3rd, W. P. Winter, et al. Hemoglobin Rush (beta 101 (g3) glutamine): a new unstable hemoglobin causing mild hemolytic anemia. Blood 1974 43(2):261-9.

Adorno, E. V., F. D. Couto, et al. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. Cad Saude Publica 2005 21(1):292-8.

Araujo, M., E. Serafim, et al. PRevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. Cad saúde pública 2004 20(1):107-21.

Bannister, W. H., J. L. Grech, et al. Hemoglobin St Luke's, or alpha 2 , 95 Arg (G2) beta 2. Euro J Biochem 1972 29(2):301-7.

Belisario, A. R., C. V. Rodrigues, et al. Coinheritance of alpha-thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. Hemoglobin 2010 34(6):516-29.

Borges, E., M. R. Wenning, et al. High prevalence of alpha-thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. Braz J Med Biol Res 2001 34(6):759-62.

Burchall, G. and E. Maxwell. Haemoglobin Stanleyville II modifies sickle disease phenotype. Pathology 2010 42(3):310-2.

Campbell, M., J. S. Henthorn, et al. Evaluation of cation-exchange HPLC compared with isoelectric focusing for neonatal hemoglobinopathy screening. Clin Chem 1999 45(7):969-75.

Cançado, R. D. Talssemias alfa. Rev Brasil Hematol Hemot 2006 28(2):81-7.

Canizares, M. E., G. Martinez, et al. [Hemoglobinopathy S with an interaction of HbS and Hb G-Ferrara]. Sangre 1983 28(6):770-4.

Chinelato-Fernandes, A. R. and C. Bonini-Domingos. Contribuição do estudo molecular de Hemoglobinas S-like para o conhecimento da diversidade genética da população brasileira. Rev Bras Hematol Hemoterapia 2005 27(3):208-12.

Chinelato-Fernandes, A. R., C. F. Mendiburu, et al. Utilization of different methodologies for the characterization of Hb Hasharon heterozygotes. Genet Mol Res 2006 5(1):1-6.

Clarke, G. M. and T. N. Higgins. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. Clin Chem 2000 46(8 Pt 2):1284-90.

Coleman, M. B., Z. H. Lu, et al. Two missense mutations in the beta-globin gene can cause severe beta thalassemia. Hemoglobin Medicine Lake (beta 32[B14]leucine-->glutamine; 98 [FG5] valine-->methionine). J Clin Invest 1995 95(2):503-9.

Costa, F. F., M. F. Sonati, et al. Hemoglobin Stanleyville II (alpha 78 Asn----Lys) is associated with a 3.7-kb alpha-globin gene deletion. Hum Genet 1991 86(3):319-20.

Costa, F. F., M. A. Zago, et al. The association of Hb Stanleyville II with alpha thalassemia and Hb S. Nouv Rev Fr Hematol 1987 29(6):387-90.

Couto, F. D., A. B. De Albuquerque, et al. alpha-Thalassemia 2, 3.7 kb deletion and hemoglobin AC heterozygosity in pregnancy: a molecular and hematological analysis. Clin Lab Haematol 2003 25(1):29-34.

Crookston, J. H., H. A. Farquharson, et al. Hemoglobin Etobicoke: alpha-84(F5) serine replaced by arginine. Can J Biochem 1969 47(2):143-6.

Cunningham MJ, Sankaran VG, Nathan DG, Orkin SH. The thalassemias. In: Orkin SH, Nathan DG, Ginsburg D, Look AT, Fisher DE, Lux SE. Hematology of Infancy and Childhood. 7th ed. Saunders:Philadelphia, 2009, p.1018.

Dherte, P., J. Vandepitte, et al. Stanleyville I and II: two new variants of adult haemoglobin. Br Med J 1959 2(5147):282-4.

Dode, C., J. Rochette, et al. Locus assignment of human alpha globin mutations by selective amplification and direct sequencing. Br J Haematol 1990 76(2):275-81.

Draube, A., J. M. Chemnitz, et al. Cytomorphologic signs of severe pernicious anemia obscured in a patient with heterozygous hemoglobin Stanleyville II. EurJ Haematol 2007 79(4):360-62.

Felice, A. E., B. B. Webber, et al. Alpha-thalassemia and the production of different alpha chain variants in heterozygotes. Biochem Genet 1981 19(5-6):487-98.

Fernandes, A. P., J. N. Januario, et al. Mortality of children with sickle cell disease: a population study. J Pediatr (Rio J) 2010 86(4):279-84.

Frischer, H. and J. Bowman. Hemoglobin E, an oxidatively unstable mutation. JLabClinMed 1975 85(4):531-9.

Fucharoen, S., S. Singsanan, et al. Rapid molecular characterization of Hb Queens and Hb Siam: two variants easily misidentified as sickle Hb. Clin Biochem 2007 40(1-2):137-40.

Giardina, B., M. Brunori, et al. Properties of hemoglobin G. Ferrara (beta57(E1) Asn replaced by Lys). Biochim Biophys Acta 1978 534(1):1-6.

Giardine, B., S. van Baal, et al. HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations: 2007 update. *Hum mutat* 2007 28(2):1-10.

Gonzalez, F. A., P. Ropero, et al. [Hemoglobin Stanleyville II [alpha78(EF7)Asn --> Lys]. First case described in Spain]. Med Clin (Barc) 2008 131(12):463-5.

Guerrasio, A., G. Saglio, et al. [Biochemical and clinical studies of 2 new Italian cases of Hb G-Ferrara heterozygosis]. Boll Soc Ital Biol Sper 1979 55(10):967-73.

Halbrecht, I., W. A. Isaacs, et al. Hemoglobin hasharon (alpha-47 aspartic acid--histidine). Isr J Med Sci 1967 3(6):827-31.

Harano, T., K. Harano, et al. Hemoglobin variant with slight instability and increased oxygen affinity, Hb Etobicoke [alpha 84 (F5) Ser replaced by Arg]: the first case detected in Japan. Hemoglobin 1982 6(6):613-7.

Harano, T., K. Harano, et al. Hb St. Luke's [alpha 95 (G2) Pro replaced by Arg] in Japan. Hemoglobin 1983 7(5):471-2.

Hardison, R. C., D. H. Chui, et al. HbVar: A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Hum mutat* 2002 19(3):225-33.

Harteveld KL, Heister AJ, Giordano PC, Losekoot M, Bernini LF. Rapid detection of point mutations and polymorphisms of the alpha-globin genes by DGGE and SSCA. *Hum mutat* 1996;7(2):114-22.

Harteveld, C. L., J. H. Groeneveld, et al. Hb zoeterwoude [beta23(B5)Val-->Ala)]: a new beta-globin variant found in association with erythrocytosis. Hemoglobin 2005 29(1):11-17.

Harteveld, C. L., F. G. Versteegh, et al. Hb Bleuland [alpha108(G15)Thr-->Asn, ACC-->AAC (alpha2)]: a new abnormal hemoglobin associated with a mild alpha-thalassemia phenotype. Hemoglobin 2006 30(3):349-54.

Harteveld, C. L., W. C. van Helden, et al. Hb Zoetermeer: a new mutation on the alpha2 gene inducing an Ala-->Ser substitution at codon 21 is possibly associated with a mild thalassemic phenotype. Hemoglobin 2007a 31(3):325-32.

Harteveld, C. L., F. G. Versteegh, et al. Hb St. Jozef, A Val-->Leu N-terminal mutation leading to retention of the methionine, and partial acetylation found in the globin gene in Cis with a -alpha3.7 thalassemia deletion. Hemoglobin 2007b 31(3):313-23.

Headlee, M. G., T. Nakatsuji, et al. Hb Etobicoke, alpha 85(F5) Ser leads to Arg found in a newborn of French-Indian-English descent. Hemoglobin 1983 7(3):285-7.

Higgs, D. R., B. E. Aldridge, et al. The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. N Engl J Med 1982 306(24):1441-6.

Higgs, D. R., M. A. Vickers, et al. A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. Blood 1989 73(5):1081-104.

Higgs DR. Gene regulation in hematopoiesis: new lessons from thalassemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2004:1-13.

Hocking, D. R. The separation and identification of hemoglobin variants by isoelectric focusin electrophoresis: an interpretive guide. (1997). 115p.

Jorge, S. E., E. M. Kimura, et al. Three new alpha-globin variants: Hb Itapira [alpha30(B11)Glu-->Val (alpha1)], Hb Bom Jesus Da Lapa [alpha30(B11)Glu-->Ala (alpha1)] and Hb Boa Esperanca [alpha16(A14)Lys-->Thr (alpha2)]. Hemoglobin 2007 31(2):151-7.

Jorge SE, Petruk AA, Kimura EM, Oliveira DM, Caire L, Suemasu CN, et al. Hb S-Sao Paulo: A new sickling hemoglobin with stable polymers and decreased oxygen affinity. Arch Biochem Biophys. 2012;519(1):23-31.

Kimura, E. M., D. M. Oliveira, et al. Identification of characterization of novel and rare variants of human hemoglobin. Rev Bras Hematol Hemoter 2008 30(4):316-19.

Lacan, P., M. Becchi, et al. Two new alpha chain variants: Hb Part-Dieu [alpha65(E14)Ala --> Thr (alpha2)] and Hb Decines-Charpieu [alpha69(E18)Ala --> Thr (alpha2)]. Hemoglobin 2004 28(1):51-7.

Lin, M., Y. Huang, et al. Hb Stanleyville II [alpha 78(EF7) Asn-->Lys] occurrence in combination with Hb Constant Spring. Blood cells MolDis 2011 46(2):145-6.

Lin, M., Q. Wang, et al. Prevalence and molecular characterization of abnormal hemoglobin in eastern Guangdong of southern China. CliniGenet 2012 81(2):165-71.

Lorkin, P. A., R. Casey, et al. The oxygen affinity of haemoglobin St. Luke's. FEBS Lett 1974 39(1):111-4.

Marinucci, M., J. P. Boissel, et al. Hemoglobin Maputo: a new beta-chain variant (alpha 2 beta 2 47 (CD6) Asp replaced by Tyr) in combination with hemoglobin S, identified by high performance liquid chromatography (HPLC). Hemoglobin 1983 7(5):423-33.

Melo, L. M. S., F. A. M. Siqueira, et al. Rastreamento de hemoglobinas variantes e talassemias com associação de métodos de diagnóstico. RevBras HematolHemot 2008 30(1):12-17.

Molchanova, T. P., D. D. Pobedimskaya, et al. The differences in quantities of alpha 2- and alpha 1-globin gene variants in heterozygotes. BrJHaematol 1994 88(2):300-6.

Moo-Penn, W. F., T. K. Hine, et al. Hb Luxembourg [alpha 24(B5)Tyr----His], Hb Maputo [beta 47(CD6)Asp----Tyr], and Hb Fukuyama [beta 77(EF1)His----Tyr]. Hemoglobin 1991 15(1-2):97-101.

Moradkhani, K., C. Préhu, et al. Mutations in the paralogous human α-globin genes yielding identical hemoglobin variants. AnnHemat 2009 88(6):535-543.

Murao, M. and M. H. C. Ferraz. Traço falciforme- heterozigose para hemoglobina S. Rev Bras Hematol Hemot 2007 29(3):223-25.

Naoum, P. C. Hemoglobinopatias e talassemias. Sao Paulo, Sarvier. (1997):168p.

North, M. L., P. D. Darbre, et al. Haemoglobin Stanleyville II (alpha75 [EF 7] Asn yeilds Lys) found in France. Acta Haematol 1975 53(1):56-9.

North, M. L., W. Hassan, et al. [Clinical and biological studies of an hybrid S/Stanleyville II hemoglobin (alpha 2 78 Asn replaced by Lys beta 2 6 Glu replaced by Val) (author's transl)]. Nouv Rev Fr Hematol 1980 22(3):235-41.

O'Brien, D. A., C. M. Flynn, et al. Haemoglobin Etobicoke, an incidental finding in an Irish diabetic. Clin Lab Haematol 2003 25(4):259-62.

Ostendorf, N., T. Glosemeyer-Allhoff, et al. Hemoglobin (Hb) Stanleyville II causes gross overestimation of the Hb A1c proportion in routine HPLC. Clin Chem 2005 51(9):1752-4.

Ostertag, W. and E. W. Smith. Hb Sinai, a new alpha chain mutant alpha his 47. Humangenetik 1968 6(4):377-9.

Ou, C. N. and C. L. Rognerud. Diagnosis of hemoglobinopathies: electrophoresis vs. HPLC. Clin Chim Acta 2001 313(1-2):187-94.

Paixão, M. C., M. H. Cunha Ferraz, et al. Reliability of isoelectrofocusing for the detection of Hb S, Hb C, and HB D in a pioneering population-based program of newborn screening in Brazil. Hemoglobin 2001 25(3):297-303.

Patrinos, G. P., B. Giardine, et al. Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. Nucleic Acids Research 2004 32(Database issue): D537-41.

Petkov, G. H., L. Simjanovska, et al. Hb Stara Zagora: a new hyper-unstable hemoglobin causing severe hemolytic anemia. Hemoglobin 2005 29(4):249-56.

Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, et al. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. Hum Hered 2006;62(4):190-5.

Pimentel, F. S., M. R. Silva, et al. Homozygous Hb Stanleyville-II [alpha2 78(EF7) Asn>Lys; *HBA2*:c.237C>A, not C>G] associated with genotype -alpha(3.7) /-alpha(3.7) in two Brazilian families. Int J Lab Hematol 2011. 33(6):566-9.

Podda, A., R. Galanello, et al. Hemoglobin Cagliari (beta 60 [E4] Val----Glu): a novel unstable thalassemic hemoglobinopathy. Blood 1991 77(2):371-5.

Pootrakul, S., S. Srichiyanont, et al. Hemoglobin Siam (alpha 2 15 arg beta 2): a new alpha-chain variant. Humangenetik 1974 23(3):199-204.

Ramalho, A. S., L. A. Magna, et al. A portaria nº822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglinopatias em sáude pública no Brasil. Cad Saúde Pública 2003 19(4):1195-99.

Rhoda, M. D., J. Martin, et al. Sickle cell hemoglobin fiber formation strongly inhibited by the Stanleyville II mutation (alpha 78 Asn leads to Lys). Biochem Biophys Res Commun 1983 111(1):8-13.

Schneider, R. G., S. Ueda, et al. Hemoglobin sealy (alpha 2-47His-beta 2): a new variant in a Jewish family. Am J Hum Genet 1968 20(2):151-6.

Serjeant, G. R., B. Wild, et al. Sickle haemoglobin and haemoglobin Stanleyville II: possible confusion with sickle cell-haemoglobin C disease. East Afr Med J 2005 82(7): 367-70.

Shih, D. T., R. T. Jones, et al. Involvement of Glu G3(101)beta in the function of hemoglobin. Comparative O2 equilibrium studies of human mutant hemoglobins. J Biol Chem 1985 260(10):5919-24.

Shih, H. C., T. K. Er, et al. Development of a high-resolution melting method for the detection of hemoglobin alpha variants. Clin Biochem 2010 43(7-8):671-6.

Sonati, M. F., S. B. Farah, et al. High prevalence of alpha-thalassemia in a black population of Brazil. Hemoglobin 1991 15(4):309-11.

Sonati Mde F, Costa FF. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. J Pediatr (Rio J) 2008 84(4 Suppl):40-51.

Stuart, M. J. and R. L. Nagel. Sickle-cell disease. Lancet 2004 364(9442):1343-60.

Tomé-Alves, R., D. P. Marchi-Salvador, et al. Hemoglobina AS/Alfa Talassemia-importância diagnóstica. Rev Bras Hemat Hemot 2000 22(3):394-9.

Turbpaiboon, C., S. Svasti, et al. Hb Siam [alpha15(A13)Gly-->Arg (alpha1) (GGT-->CGT)] is a typical alpha chain hemoglobinopathy without an alpha-thalassemic effect. Hemoglobin 2002 26(1):77-81.

Van Ros, G., D. Beale, et al. Haemoglobin Stanleyville II (alpha asparagine replaced by lysine). Br Med J 1968 4(5623):92-3.

Vella, F., R. Casey, et al. Haemoglobin Ottawa: alpha2 15 (A13) Gly --> Arg beta2. Biochim Biophys Acta 1974 336:25-9.

Wagner, S. C., S. M. de Castro, et al. Neonatal Screening for Hemoglobinopathies: Results of a Public Health System in South Brazil. Genet Test Mol Biomarkers 2010 14(4):565-9.

Waitumbi, J. N., C. M. Kifude, et al. Hb G-Philadelphia or Stanleyville II? When the phenotype and genotype do not agree. Eur J Haematol 2007 79(2): 177-8.

Wajcman, H. and F. Galactéros. Hemoglobins with High Oxygen Affinity Leading to Erythrocytosis. New Variants and New Concepts. Hemoglobin 2005 29(2):91-106.

Weatherall, D. J. and J. B. Clegg. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. Bull World Health Organ 2001 79(8):704-12.

Wenning, M. R., E. M. Kimura, et al. alpha-globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. Braz J Med Biol Res 2000 33(9):1041-5.

Wettinger, B. S. Galdies, R, et al. Characterization and locus assignment of two alpha-globin variants present in the Maltese population: Hb St. Luke's [alpha95(G2)Pro-->Arg] and Hb Setif [alpha94(G1)Asp-->Tyr]. Hemoglobin 1999 23(2):145-57.

Williams, J. P., J. H. Scrivens, et al. Hb Leeds [beta56(D7)Gly-->Cys]: a new hemoglobin that aggravates anemia in a child with beta(0)-thalassemia trait. Hemoglobin 2007 31(3):367-73.

Yodsowan, B., J. Svast, et al. Hb Siam [alpha15(A13)Gly-->Arg] is a GGT-->CGT mutation in the alpha1-globin gene. Hemoglobin 2000 24(1):71-5.

Zamaro, P. J. and C. R. Bonini-Domingos. Abnormal hemoglobin phenotypes in carriers of mild anemia in Latin America. Genet Mol Res 2010 9(1):425-8.

5- OBJETIVO GERAL

Estudar os genes da hemoglobina em crianças cujos perfis eletroforéticos e/ou cromatográficos nos exames de triagem neonatal de MG foram registrados como indeterminado ao nascimento e que, reanalisados no 6º mês de vida, apresentaram-se com perfil semelhante ou igual ao da hemoglobina S.

5.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar hemoglobinas variantes incomuns que ocorrem em Minas Gerais e verificar a relevância clínica dessas hemoglobinas;
2. Estudar a associação de alfa talassemia com as hemoglobinas variantes; determinar se as hemoglobinas variantes de cadeia alfa estão presentes no gene *HBA1*, *HBA1* ou híbrido, se houver deleção talassêmica;
3. Otimizar PCR-RFLP para identificação das mutações gênicas correspondentes a hemoglobinas variantes incomuns que ocorrerem com frequência mais elevada em MG ou nas quais for importante a distinção com a Hb S.

6- PACIENTES E MÉTODOS

6.1- ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi desenvolvido dando continuidade à pesquisa intitulada "Identificação de hemoglobinas com corrida eletroforética semelhante à da hemoglobina S no Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PTN-MG)", defendida como dissertação de mestrado por Fernanda Silva Pimentel. Essa pesquisa havia sido aprovada nas instâncias acadêmicas da Faculdade de Medicina da UFMG e dos Comitês de Ética em Pesquisa da UFMG (parecer nºETIC295/07), da Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais - Hemominas (ofício nº67/2007) e pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital das Clínicas da UFMG (processo nº106/2007).

Para o desenvolvimento do estudo acima citado foi realizado contato com as Unidades Básicas de Saúde (UBS) para fornecer esclarecimentos sobre a pesquisa, solicitar que fossem realizadas as coletas de amostras de sangue total em papel filtro e a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos pais ou responsáveis.
Como no presente estudo o objetivo era estudar as mesmas crianças da pesquisa anterior, identificando-se as hemoglobinas variantes, foram incluídas apenas as crianças cujos pais ou responsáveis já haviam autorizado a participação no estudo.

Para a inclusão de outras pessoas no estudo (ver explicações abaixo), foi solicitada a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos pais ou responsáveis (Anexo 16.1).

A pesquisa atual foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG (parecer nºETIC 163/08) (Anexo 16.2) e pelo Comitê de Ética (CEP) da Fundação Hemominas (Ofício nº15/2009) (Anexo 16.3).

6.2- POPULAÇÃO ESTUDADA

No banco de dados *SQL Server 2000 (Microsoft®)*, utilizado rotineiramente pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PTN-MG), havia 294 crianças triadas no período de março de 1998 a junho de 2008 provenientes de 56 cidades de MG cujo primeiro resultado da triagem neonatal havia sido liberado como indeterminado e o

resultado da amostra do 6º mês de vida, registrado como perfil eletroforético semelhante ou idêntico ao da hemoglobina S (Figura 4).

.

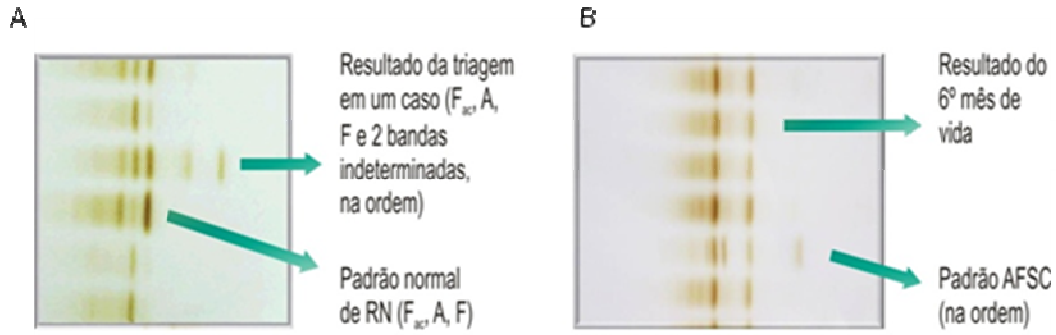


Figura 4- Visão parcial de gel de IEF contendo Hb variante. A- Resultado da triagem neonatal ao nascimento. B- Resultado do 6º mês de vida.

Das 294 crianças, 128 (43,5%) participaram da pesquisa de Fernanda Silva Pimentel na qual foi realizada a PCR alelo-específica para a HbS. Destas, novo contato para coleta de sangue total foi bem sucedido em 118 famílias: 7 não foram localizadas na busca ativa realizada pela UBS e em 3 casos a UBS não quis colaborar na coleta de sangue. Embora as amostras colhidas em papel filtro para a pesquisa de Fernanda ainda estivessem disponíveis, coleta de sangue total foi necessária, pois para o diagnóstico molecular de alfa talassemia é necessário o isolamento de DNA a partir de sangue total, pois fracassaram as tentativas de fazê-lo a partir do papel filtro. Essa coorte de 118 crianças (Figura 5) foi utilizada para cálculo da incidência de hemoglobinas variantes em Minas Gerais. A IEF ao nascimento e do 6º mês de vida das 176 crianças que pertenciam a coorte original e que não participaram do estudo molecular foram analisadas para calcular a incidência da Hb Stanleyville-II.

Outras quatro crianças foram adicionadas no presente estudo por solicitação de médicos que estavam acompanhando essas crianças em atendimento ambulatorial na Fundação Hemominas. Elas não foram utilizadas no cálculo de incidência de hemoglobinas variantes em MG porque três delas nasceram após o período estabelecido para definição da coorte e uma possuía provável associação de hemoglobina variante com a hemoglobina C e não com a S.

Dezesseis membros de uma família com descendência italiana que estavam em acompanhamento na Fundação Hemominas foram adicionados nesse estudo. O *propositus* não havia participado da triagem neonatal, pois nasceu antes do início do

programa para hemoglobinopatias em Minas Gerais. Os pacientes apresentavam uma anemia hemolítica média a moderada e um perfil de bandas na eletroforese diferente do habitual: em pH básico três bandas, uma correspondente à Hb A e duas indeterminadas na posição da Hb fetal e, em pH ácido, uma correspondente à Hb A e outra entre as posições das Hbs S e C.

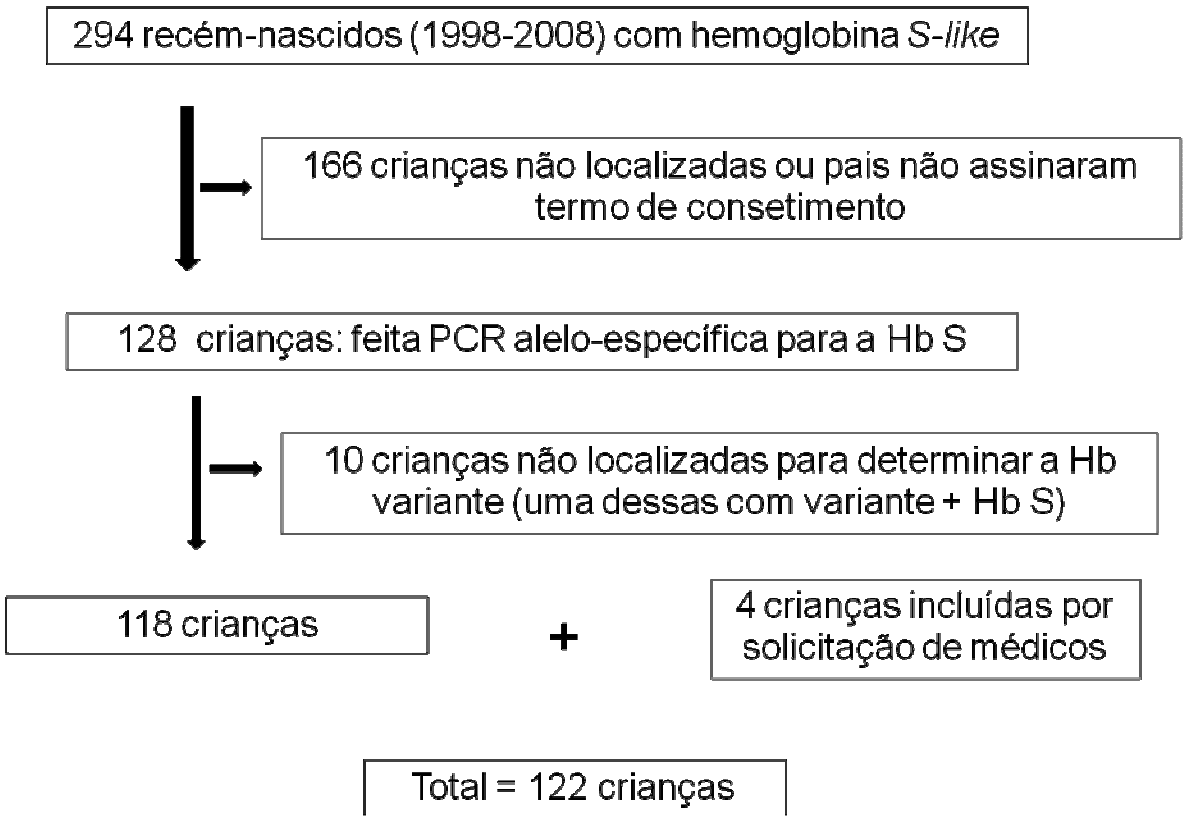


Figura 5- Fluxograma contendo detalhes sobre a população estudada

6.3- DIAGNÓSTICO DE HEMOGLOBINOPATIAS EM MINAS GERAIS

O PTN-MG foi criado em setembro de 1993, numa ação conjunta entre a Secretaria de Estado de Saúde e a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Atualmente esse programa viabiliza o diagnóstico precoce de doença falciforme, fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito e fibrose cística. Ele envolve o Ministério da Saúde, a Secretaria Estadual de Saúde, a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), a Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa (Fundep), a Fundação Hemominas, as Secretarias Municipais de Saúde e o Centro Geral de Pediatria (CGP).
Para a realização dos testes o PTN-MG realiza coleta de amostras de sangue em 1.933 postos de coletas, localizados principalmente nas unidades básicas de saúde, dos 853

municípios no estado.As amostras de sangue são coletadas, preferencialmente, do terceiro ao quinto dia de vida, do calcanhar dos recém-nascidos, em papel-filtro, seguindo os critérios estabelecidos para a triagem neonatal das demais doenças triadas (Januário & Mourão, 1998). Após a secagem, as amostras são acondicionadas em envelope contendo todos os dados de identificação da criança e transportadas, por correio ou portador, ao laboratório de triagem neonatal do NUPAD, localizado no quinto andar da Faculdade de Medicina da UFMG, em Belo Horizonte onde são processadas.

As crianças com resultado positivo para a doença falciforme ou outras hemoglobinopatias são encaminhadas para acompanhamento médico em um dos centros regionais da Fundação Hemominas, cabendo ao Nupad, através do setor de controle de tratamento, a responsabilidade pelo controle e acompanhamento dos casos especiais, como por exemplo casos de crianças faltosas nas consultas ou que abandonaram o tratamento. O PTN-MG oferece aos pais das crianças com resultado positivo para hemoglobinopatias a realização do estudo familiar, de forma a complementar à avaliação do diagnóstico.

A triagem para hemoglobinopatias foi implantada no PTN-MG em março de 1998. Do início do programa até março de 2002 apenas o método de eletroforese por focalização isoelétrica (IEF) foi utilizado na determinação do perfil hemoglobínico dos recém-nascidos (Paixão *et al.*, 2001). Foram utilizados insumos e equipamentos de eletroforese Wallac Resolve Systems® (Ohio, EUA) e *Resolve Neonatal Hemoglobin Screen Kit* (*PerkinElmer Life and Analytical Sciences*, Finlândia). As amostras com resultados alterados ou duvidosos foram repetidas pelo mesmo método, para confirmação.

A partir de março de 2002, o laboratório passou a trabalhar também com a técnica de cromatografia líquida de alta resolução utilizando o equipamento *Bio-Rad Variant Hemoglobin Test System* e insumos do *Kit Sickle Cell Short*, também da *BIO-RAD*. No presente momento (maio de 2012), as amostras têm sido avaliadas somente por IEF e os casos suspeitos de doença falciforme são confirmados por testes moleculares utilizando-se PCR alelo-específica para o códon 6 selvagem, mutações da Hb C e S, além da mutação que gera a Hb D-Punjab no códon 121.

6.3.1- CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (HPLC) - KIT *VARIANT TM SICKLE CELL SHORT PROGRAM*

O *Kit Sickle Cell Short Program* utiliza os princípios do HPLC através da troca catiônica.

As amostras diluídas são mantidas no *Variant* a 12 ± 2º C na câmara do amostrador automático e, posteriormente, são injetadas sequencialmente no fluxo de análise. Por meio da utilização de um gradiente de íon fosfato, gerado pela mistura de dois tampões de diferentes forças iônicas para eluição, as hemoglobinas são separadas por uma coluna de troca catiônica.

Duas bombas de duplo pistão controlam o fluxo da mistura dos tampões (1 e 2) de eluição na coluna analítica. A força iônica desta mistura é incrementada pelo aumento da contribuição (percentagem) do tampão 2. À medida que a força iônica da mistura aumenta, maior é a quantidade de hemoglobinas retidas que atingem a eluição a partir da coluna analítica.

Um fotômetro de filtros com duplo comprimento de onda (415 e 690 nm) monitora a eluição a partir da coluna. À medida que as hemoglobinas eluem na coluna e passam pelo fotômetro de filtros, são detectadas alterações na absorbância a 415 nm. Um filtro secundário de 690 nm corrige na linha de base os efeitos causados pela mistura de tampões de diferentes forças iônicas. Os dados são processados e é gerado um cromatograma (gráfico de absorbância *versus* tempo) impresso, que contém os diferentes picos referentes às hemoglobinas identificadas em diferentes janelas, o tempo de retenção, a área das mesmas e o percentual relativo de cada uma delas. Cada hemoglobina ou grupo de hemoglobinas têm um tempo de retenção característico. O tempo de retenção é medido desde o momento da injeção da amostra até o ponto máximo de cada pico. A identificação das hemoglobinas é feita pela comparação do tempo de retenção da hemoglobina desconhecida com o tempo de retenção de hemoglobinas conhecidas, analisadas no mesmo sistema (Colah *et al.*, 2007).

6.3.2- ELETROFORESE POR FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA (IEF) - *HEMOGLOBIN TEST KIT*

A IEF é um método de eletroforese que separa proteínas tendo como base seus pontos isoelétricos (pI) em um gradiente de pH (Hocking, 1997).

A separação das hemoglobinas é realizada por meio da aplicação da amostra de hemolisado sobre um gel de agarose contendo anfolitos *RESOLVE* com pH entre 6 e 8. Os anfolitos *RESOLVE* são compostos de moléculas anfotéricas de baixo peso molecular e variados pontos isoelétricos. Quando uma corrente elétrica é aplicada no gel, essas moléculas migram sobre o gel até seus pontos isoelétricos (pI's), formando um gradiente de pH estável, geralmente entre 6 e 8.

As proteínas são formadas por cadeias de aminoácidos que possuem propriedades anfotéricas (podem ser carregadas positivamente ou negativamente). Essas propriedades deixam as proteínas carregadas quando em meio líquido, podendo movimentar-se na presença de uma corrente elétrica. O pH de uma solução na qual um aminoácido é colocado determina suas cargas, modificando seus grupos (carboxi ou amino), tornando-os positivos ou negativos de acordo com o pH.

Quando uma corrente elétrica é aplicada, as hemoglobinas migram sobre o gel até alcançarem a área onde seus pI's se igualem ao pH correspondente no gel. O ponto isoelétrico corresponde à carga total zero da proteína: neste ponto, o número das cargas negativas se iguala ao das cargas positivas e a migração cessa. No ponto isoelétrico cessa a difusão da hemoglobina focalizando uma banda fina e discreta.

6.4- CONTATO COM AS UNIDADES BÁSICAS DE SAÚDE

A partir das informações existentes no banco de dados do Nupad e das planilhas Excel contendo dados da pesquisa de mestrado de Fernanda Pimentel foi feito, via telefone e logo após, via correspondência (Anexo 16.4), novo contato com a unidade básica de saúde para explicações sobre a necessidade de nova coleta de amostra de sangue total. Kits contendo todo o material necessário para a coleta do sangue total em tubo com EDTA e a adequada refrigeração, para posterior envio pelo correio a Belo Horizonte (BH), foram enviados a todas as UBS envolvidas.

Também foi feito contato com os pais, via telefone e correspondência, para explicar que nova coleta de sangue total seria necessária para identificar a Hb da criança (Anexo 16.5).

Após concluído o estudo molecular, foi enviada às UBS correspondência contendo o resultado da pesquisa da criança na forma de carta explicativa em três vias para que os funcionários as distribuíssem da seguinte maneira: uma para ser colocada no prontuário médico da criança na UBS (Anexo 16.6) , uma para ser arquivada na UBS e

uma para ser entregue aos pais ou responsáveis pela criança (Anexo 16.7). Foi solicitada à UBS que fosse marcada uma consulta com o pediatra ou clínico geral da unidade para que o mesmo entregasse a carta para a mãe e tirasse as dúvidas que ela apresentasse. Esse procedimento foi adotado nos casos das crianças que tiveram o resultado da triagem neonatal do 6º mês de vida liberado como Hb A associada a uma variante rara, pois nesses casos tratava-se tão somente de esclarecimento do diagnóstico feito inicialmente, sem consequências clínicas relevantes. Nos casos em que o resultado havia sido liberado como traço falciforme (perfil hemoglobínico AS), os familiares foram convidados para consulta clínica no Hemocentro de Belo Horizonte, com a finalidade de explicar o equívoco cometido e entrega do correspondente documento pelo médico responsável pela pesquisa.

O telefone gratuito do Centro de educação e apoio para hemoglobinopatias (Cehmob Atende -0800) foi colocado na carta aos pais para que os mesmos entrassem em contato caso surgissem dúvidas adicionais.

6.5- DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Os dados hematológicos foram gerados pelo laboratório de Hematologia da Fundação Hemominas e os dados clínicos obtidos nas consultas médicas realizadas no consultório médico do setor de pesquisa da Fundação Hemominas-BH.

As consultas médicas foram marcadas para 63 crianças devido aos seguintes motivos: 51 tiveram resultado da triagem neonatal, ao sexto mês de vida, liberado como AS (grupo A); sete eram portadoras de variantes de Hb com poucos casos descritos na literatura (grupo B) e cinco eram crianças que apresentaram traço falciforme associado a outra Hb variante (grupo C). Dezenove crianças faltaram à consulta, sendo 17 pertencente ao grupo A (14 Hb Stanleyville-II, 2 Hasharon e 1 Ottawa), uma ao grupo B (Hb Ottawa) e uma ao grupo C (Hb Ottawa co-herdadada com Hb S). Foram realizadas, portanto, 44 consultas: do grupo A consultaram-se 33 crianças (29 crianças com Hb Stanleyville-II, duas com Hasharon, uma G-Ferrara, uma Maputo), do grupo B consultaram-se 6 crianças (duas com Hb Hasharon, duas Ottawa, uma G-Ferrara e uma Etobicoke) e por fim, do grupo C consultaram-se quatro crianças (uma com a Hb St Luke's e três com a Stanleyville-II).

Nas consultas, os pais ou responsáveis receberam uma carta explicativa contendo o resultado da pesquisa (Anexo 7), um esclarecimento sobre a variante de Hb

que a criança apresentava e sobre a co-herança de alfa-talassemia, quando era o caso. Após a consulta, nova amostra de sangue total da criança foi colhida para a realização da eletroforese de Hb em meio ácido e alcalino e hemograma. Procedimento similar foi adotado com o progenitor que a acompanhava com o intuito de se fazer o estudo familiar, caso houvesse concordância para tal.

Os dados hematológicos avaliados foram: concentração total de Hb (g/dL), volume corposcular médio (VCM, fL), Hb corpuscular média (HCM, pg), leucometria total ($x10^9$/L), concentração de Hb fetal, dosagem de Hb A_2 e contagem de reticulócitos. O contador eletrônico de células T-890, COUTER foi utilizado para realizar o hemograma. A quantificação de Hb fetal foi realizada pelo método de imunodifusão radial (*HbF Quiplate, Helena Laboratories*) e a contagem de reticulócitos foi realizada sob microscopia óptica, corando-se o esfregaço com azul de cresil brilhante.

6.6- ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA

Para a eletroforese de Hb obtém-se hemolisado homogeneizando 10 µL de papa de hemácia com 100 µL de solução hemolisante (*REP/SPIFE hemolysate reagent-Helena Laboratories*). O sangue deve ser coletado em tubo contendo EDTA e deixado em repouso ou centrifugado para a separação dos componentes do sangue. Foram colocados 17 µL do hemolisado no poço da placa. A eletroforese é realizada em gel alcalino (agarose) e ácido (ágar citrato) (*Helena Laboratories*) e a coloração das bandas para melhor visualização é feita com azul ácido (*acid blue stain, Helena Laboratories*). A eletroforese foi feita em aparelho SPIFE 3000 (*Helena Laboratories*) pela técnica responsável pelo laboratório de hematologia da Fundação Hemominas.

6.7- ELETROFORESE DE CADEIA GLOBÍNICA

Com o objetivo de definir se seriam utilizados os iniciadores direcionados para o gene *HBA* ou *HBB*, foi feita inicialmente a eletroforese de cadeias globínicas para identificar se a criança possuía uma Hb variante de cadeia alfa ou beta. Entretanto, essa eletroforese foi necessária para poucas crianças, uma vez observado o padrão de bandas na IEF ao nascimento quando comparado com o do sexto mês de vida. Se a banda com localização diferente da habitual desaparecia na IEF do sexto mês de vida, tratava-se de variante de cadeia gama; se o padrão da IEF ao nascimento era de uma banda

relativamente forte entre as posições das Hbs S e C (alfa^{Var}gama^{A}) e no sexto mês a mesma desaparecia e deslocava-se para a posição de S (alfa^{Var}beta^{A}), tratava-se de variante de alfa. Caso a banda da Hb variante se localizasse perto da posição S na IEF de nascimento, mantendo a mesma posição no sexto mês, provavelmente tratava-se de variante beta. A co-herança de alfa-alassemia e de mutações simultâneas em duas cadeias tornavam a interpretação mais complexa, principalmente se havia co-herança do gene beta S, comum em MG.

Para a eletroforese de cadeia globínica, foi feito um hemolisado adicionando-se 10 µL de sangue total a 100 µL de um reagente hemolisante (Helena Laboratories). Essa solução foi homogeneizada cinco vezes com a pipeta automática. Em seguida, em outro tubo, 25 µL do hemolisado foram misturados com igual volume de 2-beta-mercaptoetanol 1M (BIORAD) e em tampão Tris-Borato-EDTA uréia, pH 8,6 (uréia 8M, Tris base 80 mM, EDTA 1,6 mM, ácido bórico 50 mM) com o objetivo de separar as subunidades do tetrâmero da hemoglobina e o grupo heme. Esta amostra foi deixada em repouso por 1 h à temperatura ambiente e então, aplicada no acetato de celulose, próxima ao polo positivo da cuba (Helena Laboratories). A fita de acetato de celulose utilizada para fazer a eletroforese foi imersa em tampão Tris-Borato-EDTA e beta-2-mercaptoetanol 1M 1% por 2 h. A corrida eletroforética foi realizada a 100 volts por 50 min e mais 40 min a 200 volts. O produto da eletroforese foi corado por meio do corante Ponceau S. Solução de ácido acético 5% foi utilizada como descorante. Após a descoloração, seguiu-se a imersão em metanol 100%. Para armazenamento da fita de acetato de celulose, ela foi transparentizada à temperatura de 60°C por 5 min com uma solução transparentizadora (metanol 84%, ácido acético 15% e glicerina 1%). Essa metodologia foi adaptada de Schneider (1974) e Bonini-Domingos (2003). É importante destacar que essa eletroforese pode ser substituída pelo HPLC de fase reversa, não disponível no laboratório..

6.8- ISOLAMENTO DE DNA GENÔMICO

Inicialmente foi testado o isolamento do DNA genômico de sangue contido em papel filtro. Para isso foi testado um método simples realizado no Centro de Pesquisa Rene Rachou-FIOCRUZ, que utiliza basicamente água e proteinase K. Depois foram testados o método da resina Chelex (Biorad), o da resina Instangene Matrix (Invitrogen), do Fenol Clorofórmio e, por fim, o do papel filtro *FTA-Classic*

(*Whatman*). Para todos os métodos, com exceção do papel filtro *FTA Classic* o qual possui picotador específico, foram utilizados círculos de papel filtro de 5 mm de diâmetro obtidos com picotador manual (Tecnosuma).

Com nenhum desses métodos foi possível amplificar o gene *HBA* e, consequentemente, não era possível fazer o diagnóstico da alfa talassemia. A partir de tal observação, o DNA foi isolado a partir de sangue total contido em tubo com EDTA pelo método fenol-clorofórmio e, posteriormente, quando houve disponibilidade no laboratório, por meio do kit comercial QIAamp® DNA Blood mini kit (QIAGEN).

6.8.1- MÉTODO FENOL/CLOROFÓRMIO

Ao tubo contendo 200 μL de sangue total ou 3 picotes de 5 mm de papel filtro contendo sangue total foram adicionados 100 μL de tampão de extração (50 mM Tris HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, SDS 1%) e proteinase K a 50 μg/mL. A amostra foi incubada a 37ºC por 16 h ou 55ºC por 3h com agitação, para digestão do material. Foi adicionado volume igual de fenol e a amostra foi agitada por 10 min em agitador de inversão, até formar uma emulsão. Foi centrifugada a 15.000 g por 10 min à temperatura ambiente. A fase aquosa superior foi retirada e transferida para um novo tubo, acrescentando-se, aproximadamente, metade de seu volume, de fenol e metade de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). A amostra foi agitada por 10 min e centrifugada a 15.000 g por 10 min. A fase aquosa superior foi retirada e transferida para novo tubo, onde se adicionou volume igual de clorofórmio-álcool isoamílico. A amostra foi novamente agitada e centrifugada. A fase aquosa superior foi transferida para novo tubo e depois acrescentado 1/10 deste volume de acetato de sódio 3M, pH 5,2. Foram adicionados 2,5 volumes de etanol a 100% a 4ºC, homogeneizados suavemente e o tubo foi colocado a –70ºC por 1 h. A seguir foi centrifugado a 15.000 g por 10 min a 4ºC. O sedimento foi lavado 2 vezes com etanol a 70%, a 4ºC, centrifugando a 15.000 g por 10 min, a 4ºC. O sobrenadante etanólico foi eliminado e o tubo contendo o sedimento foi incubado, com a tampa aberta, a 37ºC para evaporar o etanol remanescente. O DNA foi eluído em 25 μL de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) e estocado a –20ºC. Este método foi inicialmente utilizado para extrair DNA, pois era o que estava disponível para ser feito no momento em que algumas amostras de DNA de sangue total

chegaram das UBS. Posteriormente, o método que passou a ser utilizado foi o do kit comercial QIAamp® DNA Blood mini kit (QIAGEN)

6.8.2-KIT COMERCIAL QIAamp® DNA Blood mini kit (QIAGEN)

Inicialmente, foi obtida a camada leucocitária por centrifugação do sangue total e depositada em microtubo de 1,5 mL.

O DNA foi obtido adicionando-se, em um microtubo de 1,5 mL, 20 μL de protease, 200 μL da camada leucocitária à temperatura ambiente e 200 μL do tampão AL homogeneizado previamente. O microtubo foi agitado em vórtex por 15 seg. O tubo foi incubado a 56^{o}C durante 30 min em *dry bath* e centrifugado brevemente em microcentrífuga para remover as gotas na tampa. Adicionaram-se 200 μL de etanol 100% e o microtubo foi agitado durante 15 segundos e centrifugado brevemente para remover as gotas na tampa. O conteúdo foi transferido para a coluna de centrifugação e essa colocada em um tubo coletor de 2 mL. Centrifugou-se a 12.000 rpm por 5 min e, em seguida, o tubo coletor foi descartado. A coluna de centrifugação foi colocada em um novo tubo coletor de 2 mL e adicionaram-se 500 μL do tampão AW1 à coluna. Centrifugou-se a 12.000 rpm por 5 min e, em seguida, o tubo coletor foi descartado. A coluna de centrifugação foi colocada em um novo tubo coletor de 2 mL e adicionaram-se 500 μL do tampão AW2 à coluna. Centrifugou-se a 14.000 rpm por 3 min e, em seguida, o tubo coletor foi descartado. A coluna de centrifugação foi colocada em um microtubo de 1,5 mL e adicionaram-se 200 μL de Tampão AE. Incubou-se à temperatura ambiente por 5 min e centrifugou-se a 10.000 rpm por 1 minuto. O DNA foi estocado a -20^{0}C até o momento do uso.

6.9- DOSAGEM DAS AMOSTRAS DE DNA

A dosagem das amostras de DNA obtidas a partir de sangue total foi realizada em espectrofotômetro *Nanovue* (*GE Healthcare*). Foi observada a absorbância para ácidos nucleicos que é obtida no comprimento de onda de 260 nanômetros (nm). Por esse método, uma unidade de absorbância 260 nm corresponde a 50 ng/μL de ácidos nucleicos; a absorbância para proteína é obtida no comprimento de onda de 280 nm. A pureza para ácidos nucleicos foi aferida pela relação das absorbâncias A260/280. Este

valor indica a relação DNA/proteína e, consequentemente, a pureza da amostra de DNA. Para a amplificação do gene *HBA* é extremamente importante o nível de pureza e quantidade de DNA. Essa dosagem não foi realizada nas amostras obtidas de sangue em papel filtro.

6.10- DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALFA-TALASSEMIA

Para o diagnóstico de alfa-talassemia delecional foi utilizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR), multiplex, do tipo *gap*, desenvolvida por Tan e colaboradores (2001). No presente estudo, foram utilizados apenas os iniciadores direcionados para detectar as deleções causadoras da alfa-talassemia do tipo 3.7 e 4.2 por serem essas mutações frequentes nos testes realizados na rotina da Fundação Hemominas. Além desses, foram utilizados os iniciadores que amplificam o gene *HBA2* normal e parte da região 3' não-transcrita do gene *LIS 1*, localizado em cromossomo diferente do gene *HBA* e utilizado como controle positivo do sucesso da amplificação do DNA. O uso de iniciadores que amplificam o gene *HBA2* normal é vantajoso, pois qualquer uma das sete deleções remove parte ou todo o gene *HBA2*. Logo, sua amplificação, juntamente com a amplificação de um alelo híbrido, indica que a mutação encontra-se em heterozigose.

O correto alinhamento dos iniciadores com as sequências de interesse foi conferido com as informações disponíveis no NCBI utilizando a ferramenta BLAST. A Tabela 2 contém informações dos iniciadores utilizados.

Tabela 2- Sequência de iniciadores utilizados para o diagnóstico molecular da alfa-talassemia, respectivas concentrações utilizadas nas reações de PCR e tamanho esperados dos fragmentos amplificados.

Nome	Seqüência 5'-3'	Concentração	Tamanho do fragmento
LIS1-F	ATACCATGGTTACCCCATTGAGC	0.5 μM	
LIS1-R	AGGGCTCATTACATGTGGACCC	0.5 μM	2.351 pb
α2/3.7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	0.2 μM	
3.7/20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	0.2 μM	2.033 pb
α2/3.7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	0.2 μM	
α2-R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	0.2 μM	1.803 pb
4.2-F	GGTTTACCCATGTGGTGCCTC	0.5 μM	
4.2-R	CCCGTTGGATCTTCTCATTTCCC	0.5 μM	1.628 pb

Adaptado de Tan *et al.*, 2001

A figura 6 representa esquematicamente o grupamento do gene *HBA* indicando a extensão representativa de cada deleção e a posição relativa de cada oligonucleotídeo.

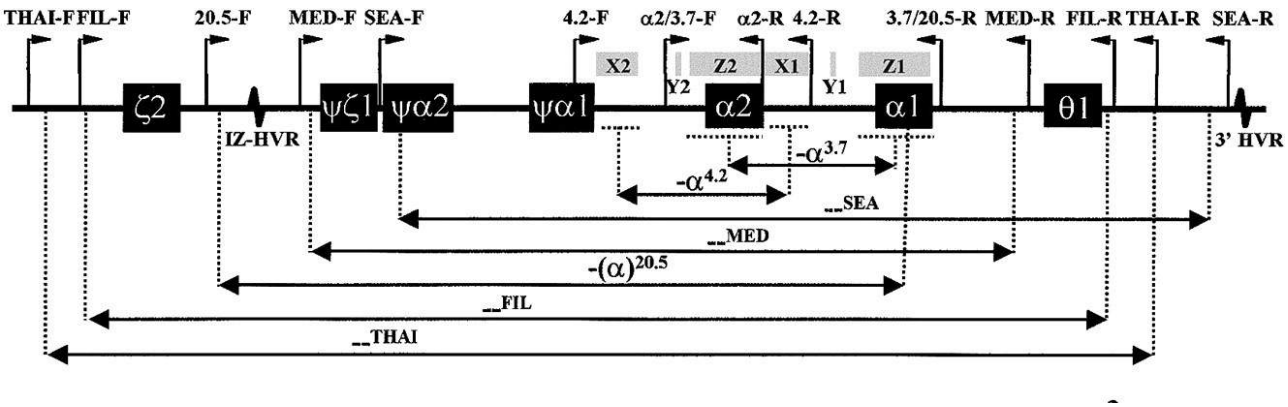


Figura 6- Ilustração do *cluster HBA*, extensão das deleções e posição dos iniciadores (Tan *et al.*, 2001)

As reações de PCR foram realizadas utilizando kit comercial para PCR multiplex (Kit Multiplex PCR Qiagen) utilizando o seguinte protocolo de reação: volume final de 25 μL contendo 12,5 μL de *master mix* (100 μM de cada dNTP, 0.75 μM $MgCl_2$ e 1.25 U HotStarTaq DNA polimerase), 2,5 μL do *pool* de iniciadores em concentrações distintas (Tabela 1), 2.5 μL de solução Q, 3,5 μL de água livre de RNA e 200 ng de DNA genômico.

Com relação aos ciclos da PCR, foram utilizadas as seguintes condições: ativação da enzima *hotstart* e desnaturação do DNA a 96°C por 15 min, seguido de 30

ciclos de 98^{o}C por 45 segundos para desnaturação do DNA, 62^{o}C por 90 segundos para anelamento dos iniciadores, 72^{o}C por 135 segundos para ação da DNA polimerase, seguido por uma extensão de 5 min a 72^{o}C.

Para visualização dos produtos da *gap* PCR *multiplex* foi realizada a eletroforese em gel de agarose. Para isso 10 □L do produto adicionado de 1 µL do tampão de corrida xileno cianol 5X (Tris 50mM pH 7,6; EDTA 5M; SDS 5%; xileno cianol 0,1%; sacarose 28%) foram aplicados em gel de agarose 1% (UltraPure ^{TM} Agarose, Invitrogen) contendo brometo de etídio (10 µg/mL). A eletroforese foi feita a 80 volts, durante 90 minutos em tampão TAE 1X (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético; 1 mM EDTA (pH 8,0). O gel foi visualizado sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos.

6.11- ESTUDO DOS GENES *HBB* e *HBA*

Como citado anteriormente, a IEF ao nascimento quando comparada à do 6º mês de vida realizadas na triagem neonatal fornece indícios se a Hb variante é de cadeia alfa ou beta. A partir dessa observação, foram utilizados os iniciadores direcionados para o gene *HBA* ou *HBB* conforme descrito abaixo.

Para o estudo dos 3 éxons do gene *HBB* foram utilizados os iniciadores desenhados por Chingchang (2005) (Tabela 3). Para a PCR foram utilizados 0,75 U de *Taq* DNA polimerase (INVITROGEN), tampão da enzima, fornecido pelo fabricante (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, 1,5 mM de $MgCl_{2,}$ KCl 50 mM), 3,0 mM de $MgCl_2$, 0,2 µM de cada iniciador, dNTPs (200 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos) e 200 ng de DNA para um volume final de 50 µL. A PCR foi realizada em termociclador *Techne*, com 5 min a 95ºC para desnaturação da fita de DNA e 35 ciclos consistindo de 30 seg a 94ºC para desnaturação, 30 seg de anelamento para os iniciadores, na temperatura calculada para cada iniciador - Tabela 2 (BGEX1L, BGEX1R, BGEX3L, BGEX3R temperatura de 55ºC e BGEX2.2R e BGEX2.1L temperatura de 52ºC) 30 seg a 72ºC para extensão, finalizando com uma extensão de 5 min a 72º C e mantido a 4ºC após o término da reação.

Tabela 3- Iniciadores utilizados para o estudo do gene *HBB*

Iniciador	Sequência 5'- 3'	Referência
BGEX1L	CATTTGCTTCTGACACAACTG	Chinchang *et al.*, 2005
BGEX1R	GGTCTCCTTAAACCTGTCTTG	Chinchang *et al.*, 2005
BGEX2.1L	TGCCTATTGGTCTATTTTCC	Chinchang *et al.*, 2005
BGEX2.2R	AACATCAAGGGTCCCATAG	Chinchang *et al.*, 2005
BGEX3L	CATGTTCATACCTCTTATCTTCCTC	Chinchang *et al.*, 2005
BGEX3R	CCCCAGTTTAGTAGTTGGACTTAG	Chinchang *et al.*, 2005

Para o estudo do gene *HBA*, inicialmente foi feita *gap* PCR *multiplex*, pois se houvesse deleção alfa talassêmica seria necessário selecionar os iniciadores adequados para o sequenciamento de DNA. Posteriormente foram feitas as PCR-RFLPs descritas abaixo.

Para o estudo dos genes *HBA1* e *HBA*2, isoladamente, foram utilizados os pares de iniciadores desenhados por LIU e colaboradores 2000 (Tabela 4). As condições da PCR foram 0,75M de betaína (Sigma), 5% DMSO, 0,1 µM de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP, 1,25 U de *Taq Platinum* (Invitrogen), tampão fornecido pelo fabricante [200 mM Tris HCl (pH8,4), 500 mM KCl], 200 ng de DNA genômico para um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em temociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf) com um aquecimento inicial de 15 min a 95º, para desnaturação da fita de DNA seguidos de 35 ciclos consistindo de 1 min a 95ºC para desnaturação, 1 min a 65º de anelamento para os iniciadores, 2 min e 30 seg a 72ºC para extensão, finalizando com uma extensão de 10 min a 72º C e mantido a 4ºC após o término da reação.

Tabela 4- Iniciadores utilizados para o estudo dos genes *HBA1* e *HBA2*

Iniciador	Sequência 5'- 3'	Referência
S1	CAC AGA CTC AGA GAG AAC C	Zorai *et al.*, 2002
S18	CGT TGG GCA TGT CGT CCA C	Zorai *et al.*, 2002
S3	CAC GGC AAG AAG GTG GCC GAC	Zorai *et al.*, 2002
S6	TCC ATT GTT GGC ACA TTC CG	Zorai *et al.*, 2002
S7	TGG AGG GTG GAG ACG TCC TG	Harteveld et al, 1996
3.7F	AAG TCC ACC CCT TCC TTC CTC ACC	Liu *et al.*, 2000
3.7(R1)	ATG AGA GAA ATG TTC TGG CAC CTG CAC TTG	Liu *et al.*, 2000
3.7(R2)	TCC ATC CCC TCC TCC CGC CCC TGC CTT TTC	Liu *et al.*, 2000

* S7 foi testado com o iniciador 3.7/20.5-R (Tabela1) para amplificar o gene híbrido ou *HBA2*, mas não foram obtidos resultados satisfatórios

Como os fragmentos obtidos com os iniciadores desenhados por Liu e colaboradores (2000) eram grandes para serem sequenciados, foram feitas *nested* PCR para o estudo dos 3 éxons dos genes *HBA1*e *HBA2*. Para amplificar o éxon 1 e parte do éxon 2 dos genes *HBA* foram utilizados os iniciadores S1 e S18 (Tabela 4). Para amplificar o restante do éxon 2 e o éxon 3 dos genes *HBA1* foram utilizados os iniciadores S3 e 3.7R1 (α2) e 3.7R2 (α1) (Tabela 4). Os iniciadores S6 e S8 desenhados por Zorai e colaboradores (Zorai *et al.*, 2002) foram testados, entretanto não foi possível a amplificação com esses iniciadores.

Para a *nested* PCR foram utilizados 0,5 µM de cada iniciador, dNTPs (200 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos), 1µL do produto amplificado com os iniciadores de LIU e colaboradores (2000) e tampão fornecido pelo fabricante (pH 8,5; 7,5 mM $MgCl_2$) para um volume final de 50 µL. Separadamente foi feito um mix contendo 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (*Go Taq*-Promega) e tampão fornecido pelo fabricante (pH 8,5, 7,5mM $MgCl_2$). O mix da enzima foi colocado no termociclador faltando 1 min e 45 seg para completar a desnaturação inicial de 5 min a 96ºC. A PCR foi realizada em termociclador *Techne*, com 5 min a 96ºC para desnaturação da fita de DNA, e 35 ciclos consistindo de 45 seg a 96ºC para desnaturação, 1 min a 60ºC para anelamento dos iniciadores, 2 min a 72ºC para extensão, seguidos de mais 5 ciclos consistindo de 45 seg a 96ºC, 1 min a 60ºC, 5 min a 72ºC e mantido a 4ºC após o término da reação.

Justifica-se a associação de iniciadores desenhados por diferentes autores pela dificuldade de se amplificar o gene *HBA* (Clark & Thein, 2004) e por erros detectados na análise das sequências depositadas no banco de dados do NCBI. Por exemplo, o iniciador S6 (Zorai *et al.*, 2002) não é específico para o gene *HBA2* e S8 (Zorai *et al.*, 2002) parece ter sido desenhado baseado em uma sequência na qual havia polimorfismo genético. A avaliação sobre a formação de dímeros e temperatura de anelamento dos iniciadores foi feita no programa *Oligos* versão 9.1.

6.12- SEQUENCIAMENTO DE DNA

O produto de PCR foi utilizado como molde para a reação de sequenciamento. No caso das variantes de cadeia alfa, os dois genes foram sequenciados para determinar em qual deles a mutação se localizava. Para a purificação, 40 µL desse produto foi adicionado a tubo contendo mesmo volume de solução de PEG 8000 20% (Prodimol).

Essa mistura foi homogeneizada com o uso da pipeta automática, incubada a 37 ºC por 15 min, centrifugada por 15 min a 13.000 rpm e o sobrenadante descartado. Posteriormente foram adicionados 125 µL de etanol 80% gelado e centrifugado por 5 min a 13.000 rpm. Esse passo do etanol foi repetido uma vez para melhor purificação do material. Após todo o etanol ter sido descartado por inversão, o tubo foi deixado com a tampa aberta por 5 min à temperatura ambiente para a completa evaporação do etanol. O DNA foi então ressuspendido em 25 µL de água a 37ºC. A mistura foi homogeneizada 3 vezes com o auxílio da pipeta e deixada a temperatura ambiente em repouso por 10 min.

Posteriormente esse produto purificado foi quantificado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio com o auxílio do *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). Foi colocado no gel 2µL desse reagente com 0,5µL do tampão de corrida fornecido pelo fabricante [10mM Tris-Hcl (pH 7,5), 1mM EDTA].

Para a reação de sequenciamento foram misturadas 3 a 10 ng de produto de PCR purificado (dependendo do tamanho do fragmento de DNA), 0,7 µM de iniciador, 3 µl do tampão de diluição (*Applied Biossystems*), 2 µl de *BIG Dye Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1* (*Applied Biossystems*) e água para completar um volume final de 20 µl. Essa reação foi realizada em termociclador 9600 (*Applied Biossystems)* com 96º por 1 min e 35 ciclos consistindo de 15 seg a 96º , 15seg na temperatura de anelamento do iniciador e 4min a 60ºC, sendo mantido a 4º após o término da reação. Para os iniciadores S1, S18, BGEX1L, BGEX1R, BGEX2.1L, BGEX2.2R, BGEX3L e BGEX3R (Tabela 3) foi utilizada a temperatura de anelamento de 50ºC e para os 3.7F, 3.7R1, 3.7R2 e S3 (Tabela 4) a temperatura de 60ºC.

Para a precipitação da reação de sequenciamento foi adicionado ao produto da reação de sequenciamento 90 µL de uma mistura contendo 60 µL de etanol 100%, 3 µL de NaAc 3M e 27 µL de água deionizada e depurificada. Essa mistura é deixada em repouso durante 15 min a temperatura ambiente, homogeneizando por inversão algumas vezes.

Posteriormente foi feita a centrifugação a 3.500 rpm por 30 mim e o sobrenadante é descartado por inversão da placa. Em seguida são adicionados 150 µL de etanol 70% mantido a -20°C. Posteriormente foi feita a inversão 10 vezes e centrifugado a 3500 rpm por 10 mim. O sobrenadante foi descartado por inversão da placa e a mesma foi centrifugada invertida por 300 rpm durante 1 min. Foi adicionado 10 µL de formamida (*Applied Biosystems*) e vortexado vigorosamente por 3 min. No momento de

colocar a placa no sequenciador a amostra de DNA foi desnaturada por 2 min a 96ºC e em seguida colocada no gelo para o transporte até o aparelho..

O sequenciamento de DNA foi realizado no sequenciador *ABI prism 3100 - Avant Genetic Analyser* (*Applied Biosystems*). Os dados foram analisados com o auxílio dos programas Bioedit versão 7.0.9.0 e *Codon Code Aligner*.

6.13- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) - POLIMORFISMO DO TAMANHO DO FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (RFLP)

Com base no fato de que foram encontrados dois casos de Hb Stanleyville-II no estudo de Fernanda Pimentel foram pesquisados sítios de restrição para a mutação que codifica essa Hb nos fragmentos obtidos na *gap*-PCR multiplex. Foi encontrado que se a mutação está presente, os fragmentos possuem apenas um sítio de clivagem para a enzima *AfeI*. Esse sítio está ausente no alelo selvagem e no gene *LIS1* utilizado como controle positivo da reação (Pimentel *et al*., 2011).

Existem casos na literatura de que a mutação que codifica a Hb Stanleyville-II estaria presente no gene *HBA1*e *HBA2* (Wenning *et al.,* 2000; Ostendorf *et al.,* 2005; *Globin gene Server*). Através da *gap* PCR *multiplex* é possível amplificar apenas o gene *HBA2* ou o gene híbrido. Então, as crianças que não apresentaram a Hb Stanleyville-II pela PCR-RFLP descrita acima tiveram o gene *HBA1* amplificado por meio dos iniciadores 3.7(F) e 3.7(R2) (Tabela 4) e posteriormente submetido a restrição com a enzima *AfeI*.

Para a detecção da Hb Stanleyville-II o produto amplificado na gap PCR (10 µL) foi incubado, por 2 h a 37ºC, com 2 U da enzima *AfeI* (*New England Biolabs*) e tampão da enzima fornecido pelo fabricante (50 mM acetato de potássio, 20 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnésio, 1 mM DTT, pH 7.9) numa reação de volume final igual a 20 µL.

Posteriormente foi realizada uma PCR-RFLP para detectar a Hb Hasharon, uma vez que existem casos dessa Hb descritos no Brasil (Wenning *et al.,* 2000; Chinelato-Fernandes & Bonini-Domingos, 2005; Chinelato-Fernandes *et al.,* 2006; Kimura *et al.,* 2008; Wagner *et al.,* 2010; Zamaro & Bonini-Domingos, 2010). Os iniciadores utilizados na *gap*-PCR multiplex foram separados em duas PCRs, uma que amplificava o gene *HBA2* (α2/3.7-F e α2-R-Tabela 2) e o gene *LIS1* (LIS1-F e LIS1-R- Tabela 2) e outra que amplificava o gene híbrido (α2/3.7-F e 3.7/20.5-R -Tabela 2) e o gene

LIS1(LIS1-F e LIS1-R- Tabela 2). O fragmento *LIS1 (*2.350 pb) é clivado em dois fragmentos (1.307 e 1.043 pb) pela enzima *TaqI.* Para detectar a Hb Hasharon o produto amplificado na gap PCR (10 µL) foi incubado, por 2 h a 65ºC, com 2 U da enzima *TaqI* (*New England Biolabs*) e tampão da enzima fornecido pelo fabricante (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA) numa reação de volume final igual a 20 µL.

Após o conhecimento, através do sequenciamento de DNA, das mutações que codificam as Hbs Ottawa, Etobicoke, St Luke's e Maputo, foram estabelecidas PCRs-RFLP que permitiram o diagnóstico dessas Hbs nos casos em que houve estudo familiar. A tabela 5 mostra todas as enzimas utilizadas para detectar as respectivas hemoglobinas variantes, os sítios de restrição, os iniciadores utilizados na PCR, o tamanho dos fragmentos obtidos na PCR e na restrição enzimática.

Para a determinação da presença da mutação que codifica a Hb Ottawa foram incubados, por 2hs a 60º, 10 µL do produto da PCR com 1U da enzima BsaJI e tampão da enzima fornecido pelo fabricante (50 mM acetato de potássio, 20 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnésio, 1 mM DTT, pH 7.9) numa reação de volume final igual a 20 µL.

Para detectar a Hb St Luke's foram incubados, por 7hs a 37ºC, 10 µL do produto da PCR com 2U da enzima NlaIV (*New England Biolabs*), 20ng de BSA e tampão da enzima fornecido pelo fabricante (50 mM acetato de potássio, 20 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnésio, 1 mM DTT, pH 7.9) numa reação de volume final igual a 20 µL.

Para detectar a Hb Maputo foram incubados, por 2hs a 37ºC, 5 µL do produto da PCR com 4U da enzima DpnII (*New England Biolabs*) e tampão da enzima fornecido pelo fabricante (100mM NaCl, 50 mM Bis Tris-HCl, 10 mM MgCl2, 1mM DTT, pH 6.0) numa reação de volume final igual a 20 µL.

Para a Hb Etobicoke foram incubados, por 2hs a 37ºC, 10 µL do produto da PCR com 2U da enzima Bsu36I (*New England Biolabs*) e tampão da enzima fornecido pelo fabricante (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl2, 1 mM DTT, pH 7.9) numa reação de volume final igual a 20 µL.Para a Hb G-Ferrara não foi encontrada enzima que possibilitasse a detecção do alelo mutado.

Tabela 5- Dados das enzimas utilizadas para detectar a presença das mutações que codificam as respectivas hemoglobinas variantes e fragmentos obtidos com a restrição enzimática

Hb	Enzima	Sítio de restrição	Iniciadores utilizados	Fragmento clivado (gene) (pb)	Fragmentos obtidos no alelo selvagem (pb)	Fragmentos obtidos no alelo mutado (pb)
Stanleyville-II	AfeI	AGC↓GCT	α2/3.7-F e α2-R	1.803 (*HBA*2)	1.803	1.386, 417
Stanleyville-II	AfeI	AGC↓GCT	α2/3.7-F e 3.7/20.5-R	2.033 (híbrido)	2.033	1.386, 647
Stanleyville-II	AfeI	AGC↓GCT	3.7F e 3.7R1	2.213 (*HBA*1)	2.213	1.627, 586
Hasharon	TaqI	T↓CGA	α2/3.7-F e α2-R	1.803 (*HBA*2)	1589, 709, 582, 327	894, 582, 327
Hasharon	TaqI	T↓CGA	α2/3.7-F e 3.7/20.5-R	2.033 (híbrido)	705, 582, 557, 185	894, 582, 557
Ottawa	BsaJI	C↓CNNGG	S1 e S18	378 (Exon 1; *HBA*1)	97, 50, 45, 42, 35, 34, 29, 22, 13, 11	97, 87, 50, 35, 34, 29, 22, 13,11
St Luke's	NlaIV	GGN↓NCC	S3 e 3.7R2	651 (éxon 3; *HBA*1)	241, 160, 110, 71, 61, 8	240, 171, 160, 71, 8
Maputo	DpnII	AGC↓GCT	BGEX2.1L e BGEX3R	519 (éxon2-β)	320, 156, 43	476, 43
Etobicoke	Bsu36I	CC↓TNAGG	3.7F e 3.7R1	2.217 (*HBA*2)	2.217	1.388, 829

Os produtos de PCR-RFLP foram detectados após fracionamento em gel de acrilamida 12% (Invitrogen) e corado pelo brometo de etídio (10 µg/mL) ou em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (10 µg/mL), dependendo da diferença de tamanho dos fragmentos.

6.14- MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Análise estatística foi realizada apenas com os dados das crianças com a Hb Stanleyville-II, pois foi encontrado número significativo de casos dessa Hb. Comparação entre as médias dos valores de Hb, VCM e HCM foi realizada para as vinte

e nove crianças com a Hb Stanleyville-II que compareceram à consulta médica (Anexo 16.8). A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar a variabilidade entre os três grupos de crianças, sem alfa-talassemia, com deleção de um gene ou com deleção de dois genes alfa. Para comparar as médias dos grupos, duas a duas, foi utilizado o teste *post hoc* de Bonferroni.

6.15- FINANCIAMENTO

A pesquisa foi desenvolvida com recursos da Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), do Centro de pesquisa Rene Rachou, Fundação Hemominas e Nupad. As bolsas de iniciação científica foram custeadas pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPQ) e FAPEMIG. A aluna de doutorado recebeu bolsa concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O orientador é bolsista pesquisador do CNPQ nível 2.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA METODOLOGIA

Bonini-Domingos, C. R. (2003). Electrophoresis of polypeptide chains. Protocols of classical laboratory methods for diagnosis of hemoglobinopathies. C. R. Bonini-Domingos. São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista - UNESP. 1**:** 19-21.

Chinchang, W., V. Viprakasit, et al. Molecular analysis of unknown beta-globin gene mutations using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) technique and its application in Thai families with beta-thalassemias and beta-globin variants. Clin Biochem 2005 38(11): 987-96.

Chinelato-Fernandes, A. R. and C. Bonini-Domingos. Contribuição do estudo molecular de Hemoglobinas S-like para o conhecimento da diversidade genética da população brasileira. Rev bras Hematol Hemot 2005 27(3): 208-12.

Chinelato-Fernandes, A. R., C. F. Mendiburu, et al. Utilization of different methodologies for the characterization of Hb Hasharon heterozygotes. Genet Mol Res 2006 5(1): 1-6.

Clark, B. E. and S. L. Thein. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. Clin LabHaematol 2004 26(3): 159-76.

Colah, R. B., R. Surve, et al. HPLC studies in hemoglobinopathies. Indian J Pediatr 2007 74(7): 657-62.

Harteveld KL, Heister AJ, Giordano PC, Losekoot M, Bernini LF. Rapid detection of point mutations and polymorphisms of the alpha-globin genes by DGGE and SSCA. Hum Mutat. 1996;7(2):114-22.

Hocking, D. R. The separation and identification of hemoglobin variants by isoelectric focusin electrophoresis: an interpretive guide. (1997). 115p.

Januário, J. and O. Mourao. Manual de organização e normas técnicas para triagem neonatal. Belo Horizonte, Coopmed. (1998).88p.

Kimura, E. M., D. M. Oliveira, et al. Identification of characterization of novel and rare variants of human hemoglobin. Rev Bras Hematol Hemoter 2008 30(4):316-19.

Liu, Y. T., J. M. Old, et al. Rapid detection of alpha-thalassaemia deletions and alpha-globin gene triplication by multiplex polymerase chain reactions. Br J Haematol 2000 108(2):295-9.

Ostendorf, N., T. Glosemeyer-Allhoff, et al. Hemoglobin (Hb) Stanleyville II causes gross overestimation of the Hb A1c proportion in routine HPLC. Clin Chem 2005 51(9):1752-4.

Paixão, M. C., M. H. Cunha Ferraz, et al. Reliability of isoelectrofocusing for the detection of Hb S, Hb C, and HB D in a pioneering population-based program of newborn screening in Brazil. Hemoglobin 2001 25(3):297-303.

Pimentel, F. S., M. R. Silva, et al. Homozygous Hb Stanleyville-II [alpha2 78(EF7) Asn>Lys; *HBA2*:c.237C>A, not C>G] associated with genotype -alpha(3.7) /-alpha(3.7) in two Brazilian families. Int J Lab Hematol 2011. 33(6):566-9.

Schneider, R. G. Differentiation of electrophoretically similar hemoglobins--such as S, D, G, and P; or A2, C, E, and O--by electrophoresis of the globin chains. Clin Chem 1974 20(9):1111-15.

Tan, A. S., T. C. Quah, et al. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. Blood 2001 98(1):250-1.

Wagner, S. C., S. M. de Castro, et al. Neonatal Screening for Hemoglobinopathies: Results of a Public Health System in South Brazil. Genet Test Mol Biomarkers 2010 14(4):565-9.

Wenning, M. R., E. M. Kimura, et al. alpha-globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. Braz J Med Biol Res 2000 33(9):1041-5.

Zamaro, P. J. and C. R. Bonini-Domingos. Abnormal hemoglobin phenotypes in carriers of mild anemia in Latin America. Genet Mol Res 2010 9(1):425-8.

Zorai, A., C. L. Harteveld, et al. Molecular spectrum of alpha-thalassemia in Tunisia: epidemiology and detection at birth. Hemoglobin 2002 26(4):353-62.

8- ARTIGO 1: Hemoglobin Stanleyville-II [alpha2 78 (EF7) Asn> Lys; *HBA2*: c.237C>A]: incidence of 1:11,500 in a newborn screening program in Brazil

Os resultados observados em relação à Hb Stanleyville-II e alguns dados gerais da pesquisa foram agrupados neste artigo que foi aceito pela revista *Hemoglobin* no mês de fevereiro de 2012. Segundo informação da Editoria, será publicado no fascículo 4 do volume 36 (2012).

.**9- ARTIGO 2:** Unstable hemoglobin Rush [beta 101(G3) Glu>Gln, HBB:c.304G>C] in a Brazilian family with moderate hemolytic anemia

Este artigo contém os resultados relativos à identificação de hemoglobina variante em vários membros de família com descendência italiana que estavam em acompanhamento na Fundação Hemominas. O *propositus* não havia participado da triagem neonatal, pois nasceu antes do início do programa para hemoglobinopatias em Minas Gerais.

O artigo foi aceito para publicação na *Annals of Hematology* em 30 de dezembro de 2011.

10- ARTIGO 3: Homozygous Hb Stanleyville-II [alpha2 78(EF7) Asn>Lys; HBA2:c.237C>A, not C>G] associated with genotype -α3.7/-α3.7 in two Brazilian families

Este artigo foi publicado como resultado do mestrado de Fernanda Silva Pimentel que foi muito relevante para o desenvolvimento da pesquisa atual. Faz parte da presente tese porque o método de polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição (PCR-RFLP) para detecção do gene mutante que codifica a hemoglobina Stanleyville-II foi desenvolvido como parte do presente trabalho de tese e a doutoranda participou ativamente da redação do artigo, figurando como segunda autora.

11- ARTIGO 4: Hb Etobicoke mutation in a hybrid *HBA212* allele [*HBA212* 84 (F5) Ser>Arg; *HBA212*: c.255C>G]

Este artigo foi aceito para publicação no periódico *Annals of Hematology* em maio de 2012. Segue o artigo no formato já publicado *online*.

12- ARTIGO 5: Descrição clínico-molecular das hemoglobinas Maputo [beta 47(CD6) Asp>Tyr *HBB*:c.142G>T] e G-Ferrara [beta 57(E1) Asn>Lys *HBB*:c.174C>A] em triagem neonatal no Brasil.

Este artigo será submetido, após versão para o inglês, ao periódico *International Journal of Laboratory Hematology*.

Artigo

Descrição clínico-molecular das hemoglobinas Maputo [beta 47(CD6) Asp>Tyr *HBB*:c.142G>T] e G-Ferrara [beta 57(E1) Asn>Lys *HBB*:c.174C>A] em triagem neonatal no Brasil

Marcilene Rezende Silva, MSc[1,2], Shimene Mascarenhas Sendin[3], Isabela Couto de Oliveira Araujo[2,] Fernanda Silva Pimentel[1], Alvaro José Romanha[4] e Marcos Borato Viana, MD, PhD[1,2]

[1]Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (Nupad), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil; [2]Departamento de Pediatria da UFMG, Belo Horizonte, Brazil; [3]Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, Brazil ; [4]Universidade Federal de Santa Catarina

Correspondência: Marcos Borato Viana, Departamento de Pediatria da UFMG, Av. Alfredo Balena, 130 – Sala 267, Belo Horizonte 30130-100 – Brazil, Fax: 55-31-34099770, e-mail: vianamb@gmail.com

Resumo

As hemoglobinas Maputo e G-Ferrara possuem ponto isoelétrico semelhante ao da Hb S e por isso podem levar a falso diagnóstico de traço falciforme em programas de triagem neonatal. Durante a rotina do programa de Minas Gerais, entre 1998 e 2008 foram detectadas 122 crianças que tiveram resultado de hemoglobina indeterminada ao nascimento e no sexto mês de vida perfil idêntico ou semelhante ao da Hb S. O DNA genômico das crianças foi utilizado para avaliar a presença do alelo β^S, de alfa-talassemia delecional e para sequenciamento dos gene HBB, HBA1 e HBA2. Nos casos de Hb Maputo também foi feita PCR-RFLP com DpnII. Das 122 crianças estudadas, doze apresentaram a Hb S, duas a Hb Maputo [beta 47(CD6) Asp>Tyr HBB:c.142G>T] e duas a Hb G-Ferrara [beta 57(E1) Asn>Lys HBB:c.174C>A], todas em heterozigose. As quatro mães eram portadoras das correspondentes hemoglobinas e mutações. Foi observada associação de alfa-talassemia em um caso de Hb Maputo e um de G-Ferrara. Na eletroforese em meio alcalino ambas as hemoglobinas possuem mobilidade semelhante à da Hb S; em meio ácido comportam-se como a Hb A. Em uma das mães foi encontrada Hb S associada à Hb G-Ferrara, na ausência de alfa-talassemia. Não foi observada alteração clínica nas crianças. As alterações hematológicas observadas nas crianças foram provavelmente devidas à presença da alfa-talassemia. Esta é a primeira descrição das hemoglobinas Maputo e G-Ferrara no Brasil e a primeira a identificar, internacionalmente, as alterações em nível molecular.

Palavras-chave: Hemoglobin G-Ferrara, hemoglobina Maputo, alfa talassemia, doença falciforme

Introdução

A Hb Maputo é variante estável de cadeia beta na qual o ácido aspártico é substituído por tirosina no códon 47, localizado na superfície externa da molécula (CD6). Foi descrita primeiramente em criança nascida em Moçambique. Ela possuía associação com Hb S, Hb 8,5 g/dL, baço palpável a 3 cm do rebordo costal, anisocitose, células em alvo, concentração de Hb A_2 levemente aumentada e de Hb fetal dentro dos limites de referência (Marinucci *et al.* 1983). Na eletroforese alcalina foi visualizada apenas uma banda na posição de S e na eletroforese ácida foram observadas duas bandas: uma na posição da Hb S e outra na posição da Hb A. Os pais da criança não apresentavam alterações clínicas e hematológicas, sendo o pai portador de traço falciforme e a mãe da Hb variante. A Hb Maputo foi descrita também em heterozigose em paciente caucasiano dos Estados Unidos, sem alterações clínicas ou hematológicas (Moo-Penn *et al.* 1991).

A Hb G-Ferrara é variante de cadeia beta levemente instável na qual ocorre substituição do aminoácido asparagina pela lisina no códon 57, posição externa da molécula. Essa Hb apresenta, em relação à Hb A, taxa mais elevada de dissociação em dímeros e aumento da afinidade da ligação do oxigênio em pH ácido, o que poderia ser explicado pela introdução de carga positiva extra na região da substituição dos aminoácidos (Giardina *et al.* 1978). Essa Hb foi descrita em famílias italianas e os portadores foram considerados hematologicamente normais (Guerrasio *et al.* 1979).
Associação da Hb G-Ferrara com a Hb S foi descrita em criança de Moçambique (Canizares *et al.* 1983). Ela apresentava ovalócitos, microcitose, poiquilocitose, anisocitose, células em alvo, drepanócitos, Hb 8,4 g/dL, hematócrito 27%, reticulócitos 8% e ferro sérico 77 µg/dL. Os dados indicam que a Hb G-Ferrara favoreceria a polimerização da hemoglobina S, resultando no quadro clínico de doença falciforme. A eletroforese alcalina mostrou na paciente uma única banda na posição da Hb S; no pai uma banda na posição da Hb A e outra na posição da Hb S; o teste de falcização foi positivo. Na mãe constatou-se o mesmo padrão do pai, entretanto o teste de falcização era negativo.

Esta é a primeira descrição das hemoglobinas Maputo e G-Ferrara no Brasil e o primeiro estudo a nível internacional que fornece dados experimentais sobre a mutação gênica subjacente à alteração proteica. O estudo dessas Hbs é importante devido ao fato

de terem ponto isoelétrico semelhante ao da Hb S, o que pode levar a falso diagnóstico de traço falciforme nos programas de triagem neonatal.

Metodologia

Foram estudadas 122 crianças do Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais, Brasil, no período de 06/1998 a 06/2008. Essas crianças tiveram resultado de Hb indeterminada ao nascimento e no 6º mês de vida observou-se perfil idêntico ou semelhante ao da Hb S (Silva *et al.* 2012).

A focalização isoelétrica (IEF) e a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) foram realizadas na triagem neonatal. No 6º mês de vida apenas a focalização isoelétrica foi realizada como método confirmatório.

O DNA genômico das crianças foi utilizado para verificar a presença do alelo β^S por *PCR* alelo especifica (Sanchaisuriya *et al.* 2004) ou por *PCR-RFLP* com a endonuclease de restrição DdeI. A presença da talassemia do tipo 3.7 e 4.2 foi verificada por *gap PCR* multiplex (Tan *et al.* 2001). Para o estudo do gene beta foram utilizados iniciadores anteriormente descritos (Chinchang *et al.* 2005). O sequenciamento de DNA foi realizado no ABI Prism 3130 (Applied Biosystems) por meio de iniciadores *forward* e *reverse* para se ter certeza da mutação encontrada.

Para confirmar a presença da Hb Maputo e fazer o estudo familiar, foi feita a restrição com a endonuclease *DpnII* no produto da *PCR* que amplifica a região alvo. Para a Hb G-Ferrara não foi realizada a *PCR-RFLP*, pois não existe endonuclease de restrição que reconheça o sítio da mutação.

Os exames hematológicos foram processando no aparelho Coulter T-890. Eletroforese de hemoglobina foi realizada em meio ácido e alcalino (*SPIFE kits, Helena Laboratories, Beaumont, TX*).

Resultados

Das 122 crianças estudadas, 16 apresentaram variantes de cadeia beta em heterozigose, sendo 12 com o alelo β^S (traço falciforme), duas com a mutação que codifica a Hb Maputo (GAT>TAT) e duas com a Hb G-Ferrara (AAC>AAA) (Figuras 1A e 1B).

Na triagem neonatal as quatro crianças tiveram Hb indeterminada ao nascimento e, quando reanalisadas no sexto mês de vida, uma criança com Hb Maputo e uma com Hb G-Ferrara tiveram seus resultados laboratoriais liberados como traço falciforme (Hb AS) e as outras duas como Hb "rara" associada à Hb A. Para o presente estudo, os geis originais da IEF foram reanalisados pelos pesquisadores e observou-se que nos quatro casos a hemoglobina variante era ligeiramente mais catódica que a Hb S.

A eletroforese de Hb dessas variantes apresentou perfil de Hb AS na eletroforese em meio alcalino e Hb AA em meio ácido. A mãe de uma das crianças com Hb G-Ferrara também possui Hb S e é, portanto, dupla heterozigota para as duas hemoglobinas (Figura 2).

No estudo molecular dos quatro casos acima citados, foram encontradas nas mães a mesma hemoglobina variante que nos filhos. O resultado da *PCR-RFLP* feito para a Hb Maputo é visualizado na figura 3. O DNA das mães das crianças com Hb G-Ferrara também foram sequenciados e mostraram a mesma alteração ilustrada na Figura 1B. Na mãe de uma das crianças foi detectada em *trans* a mutação beta 6(A3) Glu>Val *HBB*:c.20A>T, característica da Hb S. No alelo β^S também se demonstrou a presença do polimorfismo rs713040 em *HBB*:c.9T>C (His>His), ausente no gene que continha a mutação G-Ferrara, pois a criança, naquela posição, era homozigota para o nucleotídeo T.

Os dados hematológicos estão resumidos na Tabela. No exame físico não foram observadas alterações clínicas. Todas as quatro famílias tinham ascendentes africanos, segundo relato das mães das crianças.

Discussão

Os casos descritos de hemoglobina Maputo e G-Ferrara na forma heterozigota são assintomáticos (Giardina *et al.* 1978, Guerrasio *et al.* 1979, Canizares *et al.* 1983, Marinucci *et al.* 1983, Moo-Penn *et al.* 1991). Os dados clínicos encontrados no presente estudo confirmam essa informação. A co-herança de Hb S pode levar a quadro clínico semelhante ao da anemia falciforme (Canizares *et al.* 1983, Marinucci *et al.* 1983). Por isso, todas as famílias envolvidas com essas variantes receberam orientação genética pertinente.

A IEF é considerada método eficiente para a detecção tanto das hemoglobinas normais como das hemoglobinas variantes, além de possibilitar a distinção de

homozigotos e heterozigotos e identificar frações em baixa concentração, como por exemplo a Hb A_2 (Paixao *et al.* 2001). Apesar da elevada sensibilidade e especificidade do método na identificação da hemoglobina S, a ocorrência de sobreposição de bandas não é desprezível. Como já citado, as hemoglobinas Maputo e G-Ferrara, por exemplo, apresentam ponto isoelétrico muito semelhante ao da Hb S. No presente estudo foi observado que essas hemoglobinas apresentaram mobilidade eletroforética ligeiramente mais lenta do que a Hb S o que destaca a importância de profissionais atentos e experientes para interpretar a IEF corretamente, evitando-se, assim, o falso diagnóstico de traço falciforme.

A talassemia do tipo 3.7 em heterozigose ocasiona microcitose e hipocromia discretas e seus portadores são assintomáticos. Tem prevalência elevada no Brasil, especialmente nos pacientes com doença falciforme (Belisario *et al.* 2010). No presente estudo foram encontradas duas crianças (uma com Hb Maputo – criança 4 e uma com Hb G-Ferrara – criança 1) com leve anemia, microcitose e hipocromia (Tabela) que podem ser devidas à co-herança de alfa-talassemia. Nas criança 3, a leve microcitose e hipocromia são de causa desconhecida.

A mãe de uma das crianças com Hb G-Ferrara co-herdou a Hb S e merecerá estudo mais detalhado sob os pontos de vista clínico e hematológico para se avaliar a relevância de tal associação.

Concluindo, trata-se do primeiro estudo das hemoglobinas Maputo e G-Ferrara em nível molecular e também dos primeiros casos descritos no Brasil. A presença das hemoglobinas Maputo e G-Ferrara pode levar a falso diagnóstico de traço falciforme ou doença falciforme se apenas a focalização isoelétrica for utilizada na triagem neonatal. São necessários testes adicionais para o diagnóstico diferencial correto e análises moleculares para identificação da hemoglobina variante. A *PCR-RFLP* com *DpnII* é método simples, rápido e econômico para o diagnóstico da Hb Maputo e dispensa o sequenciamento de DNA. Entretanto essa técnica não pode ser feita no caso da Hb G-Ferrara, pela inexistência de enzima de restrição adequada.

Referências

Belisario, A.R., Rodrigues, C.V., Martins, M.L., Silva, C.M. & Viana, M.B., 2010. Coinheritance of alpha-thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. *Hemoglobin,* 34 (6), 516-29.

Canizares, M.E., Martinez, G., Hernandez, S., Raymond, P. & Colombo, B., 1983. [Hemoglobinopathy S with an interaction of Hb S and Hb G-Ferrara]. *Sangre (Barc),* 28 (6), 770-4.

Chinchang, W., Viprakasit, V., Pung-Amritt, P., Tanphaichitr, V.S. & Yenchitsomanus, P.T., 2005. Molecular analysis of unknown beta-globin gene mutations using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (pcr-sscp) technique and its application in Thai families with beta-thalassemias and beta-globin variants. *Clin Biochem,* 38 (11), 987-96.

Giardina, B., Brunori, M., Antonini, E. & Tentori, L., 1978. Properties of hemoglobin G-Ferrara (beta57(E1) Asn replaced by Lys). *Biochim Biophys Acta,* 534 (1), 1-6.

Guerrasio, A., Saglio, G., Camaschella, C., Pich, P.G., Barberis, E., Del Ponte, D. & Izzo, P., 1979. [Biochemical and clinical studies of 2 new italian cases of Hb G-Ferrara heterozygosis]. *Boll Soc Ital Biol Sper,* 55 (10), 967-73.

Marinucci, M., Boissel, J.P., Massa, A., Wajcman, H., Tentori, L. & Labie, D., 1983. Hemoglobin maputo: A new beta-chain variant (alpha 2 beta 2 47 (CD6) Asp replaced by Tyr) in combination with hemoglobin S, identified by high performance liquid chromatography (HPLC). *Hemoglobin,* 7 (5), 423-33.

Moo-Penn, W.F., Hine, T.K., Johnson, M.H., Jue, D.L., Piersma, H., Therrell, B., Jr. & Chu, A., 1991. Hb Luxembourg [alpha 24(B5)tyr→his], Hb Maputo [beta 47(cd6)asp→tyr], and Hb Fukuyama [beta 77(EF1)his→tyr]. *Hemoglobin,* 15 (1-2), 97-101.

Paixao, M.C., Cunha Ferraz, M.H., Januario, J.N., Viana, M.B. & Lima, J.M., 2001. Reliability of isoelectrofocusing for the detection of Hb S, Hb C, and Hb D in a pioneering population-based program of newborn screening in brazil. *Hemoglobin,* 25 (3), 297-303.

Sanchaisuriya, K., Chunpanich, S., Fucharoen, G. & Fucharoen, S., 2004. Multiplex allele-specific pcr assay for differential diagnosis of hb S, hb D-Punjab and Hb Tak. *Clin Chim Acta,* 343 (1-2), 129-34.

Silva, M.R., Sendin, S.M., Pimentel, F.S., Velloso-Rodrigues, C., Romanha, A.J. & Viana, M.B., 2012. Hemoglobin Stanleyville-II [alpha2 78 (EF7) Asn>Lys; HBA2: c.237C>A]: Incidence of 1:11,500 in a newborn screening program in Brazil. *Hemoglobin* [in press].

Tan, A.S., Quah, T.C., Low, P.S. & Chong, S.S., 2001. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood,* 98 (1), 250-1.

Tabela: Exames hematológicos de quatro crianças e respectivas mães, portadores de hemoglobina G-Ferrara e Maputo.

	Idade (anos)	Genótipo *HBB*	Eletroforese de Hb	Hb (g/dL)	VCM (fL)	HCM (pg)	Genótipo *HBA*	Hematoscopia
Criança 1	9,6	$\beta^{A}\beta^{G\text{-}Ferrara}$	A 69%; F 1%; G-Ferrara 28%; A_2 3%	11,6	74,5	24,5	$\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$	Hipocromia, microcitose, células em alvo, poiquilocitose
Mãe 1	38	$\beta^{S}\beta^{G\text{-}Ferrara}$	F 3%; S 51%; G-Ferrara 41%; A_2 5%	12	76,4	24,4	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	Hipocromia e células em alvo
Criança 2	10,1	$\beta^{A}\beta^{G\text{-}Ferrara}$	A 59%; F 2%; G-Ferrara 36%; A_2 3%	14,8	84,8	29,2	αα/αα	Células em alvo
Mãe 2	38	$\beta^{A}\beta^{G\text{-}Ferrara}$	A 62%; F 2%; G-Ferrara 34%; A_2 2%	14	95,7	33,1	§	Células em alvo
Criança 3	1,3	$\beta^{A}\beta^{Maputo}$	A 56%; F 1%; Maputo 41%; A_2 2%	14,2	78,6	25,8	αα/αα	Hipocromia, microcitose e anisocitose
Mãe 3	30,2	$\beta^{A}\beta^{Maputo}$	A 61%; F 1%; Maputo 36%; A_2 2%	14,0	§	§	§	§
Criança 4	3,6	$\beta^{A}\beta^{Maputo}$	A 58%; F 2%; Maputo 38%; A_2 2%	11,5	77,9	25,7	$\alpha\alpha/-\alpha.^{3.7}$	Sem alterações
Mãe 4	§	$\beta^{A}\beta^{Maputo}$	A 56%; F 2%; Maputo 40%; A_2 2%	13,5	88	29,3	αα/αα	Sem alterações

§ dado não disponível

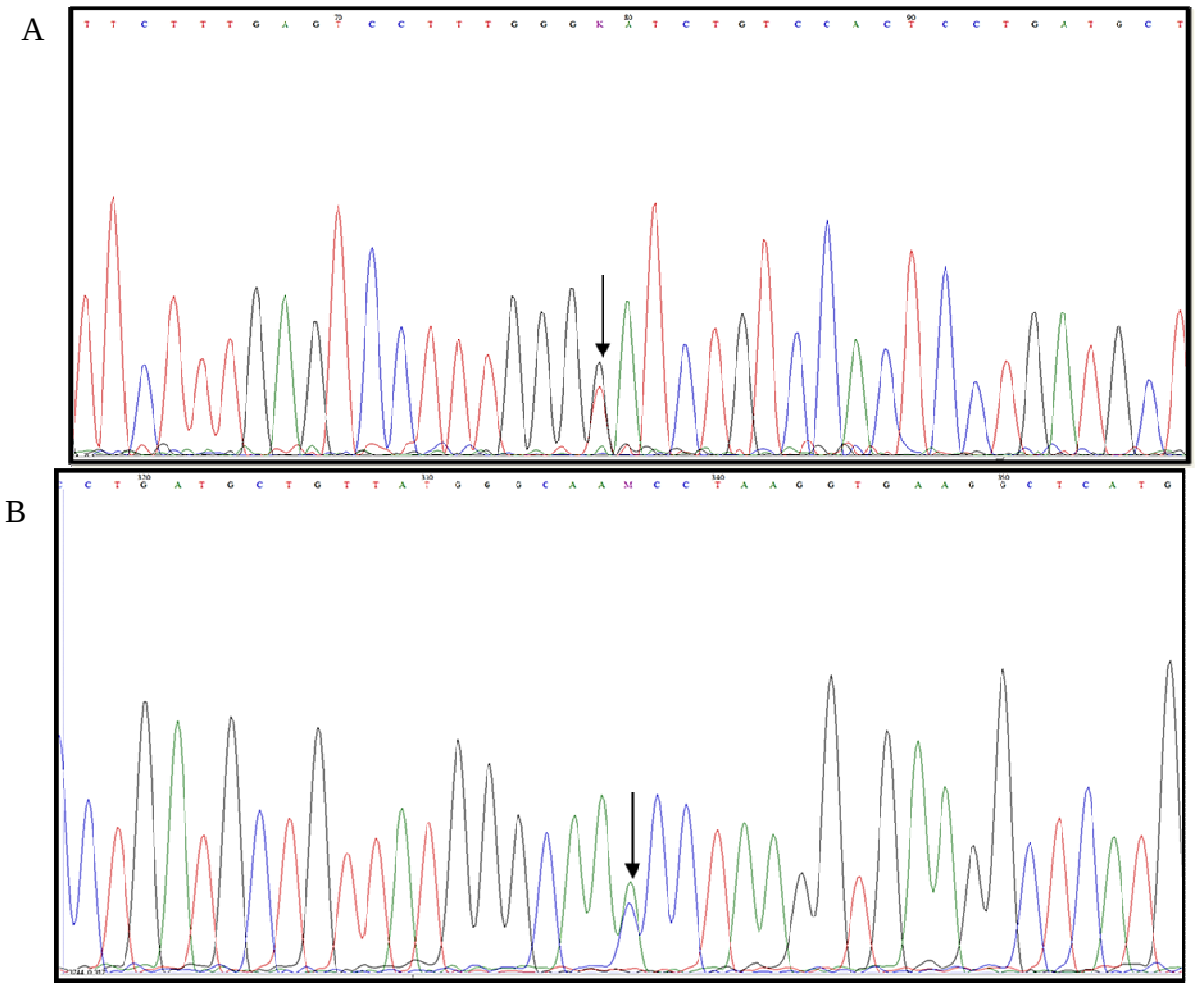


Figura 1- Eletroforegrama correspondente ao sequenciamento do éxon 2 do gene *HBB*. A- Sequência de DNA de uma das crianças que possui a mutação GAT>TAT em heterozigose no códon 47 (seta), a qual resulta em Hb Maputo. B- Sequência de DNA de uma das criançaa que possui a mutação AAC>AAA em heterozigose no códon 57 (seta), a qual resulta em Hb G-Ferrara.

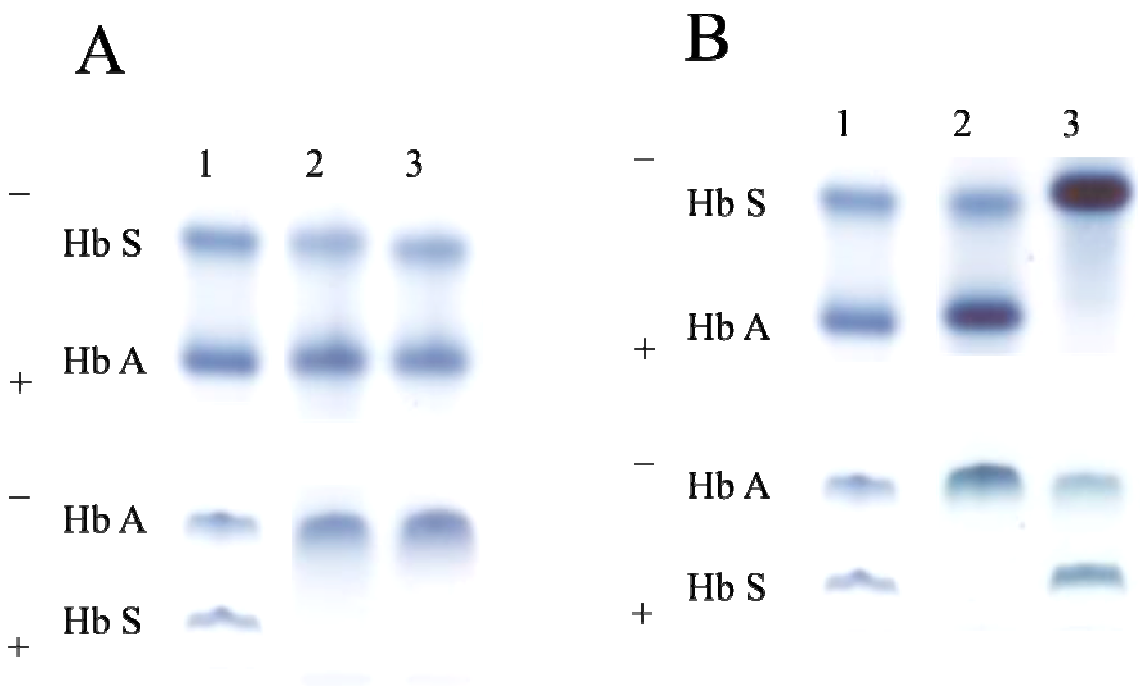


Figura 2- Eletroforese de hemoglobina em pH alcalino (parte superior) e ácido (parte inferior). O indivíduo amostrado na canaleta 1 é o controle AS. Painel **A**: hemoglobina Maputo em heterozigose numa das crianças (canaleta 3) e sua mãe (canaleta 2). Em meio alcalino, a Hb Maputo tem mobilidade semelhante à da Hb S; em meio ácido, semelhante à da Hb A. Painel **B**: hemoglobina G-Ferrara em heterorizogose numa das crianças (canaleta 2). A amostra 3 pertence à sua mãe que é dupla heterozigota para a Hb G-Ferrara e Hb S. A mobilidade eletroforética da Hb G-Ferrara nos meios alcalino e ácido é semelhante à da Hb Maputo.

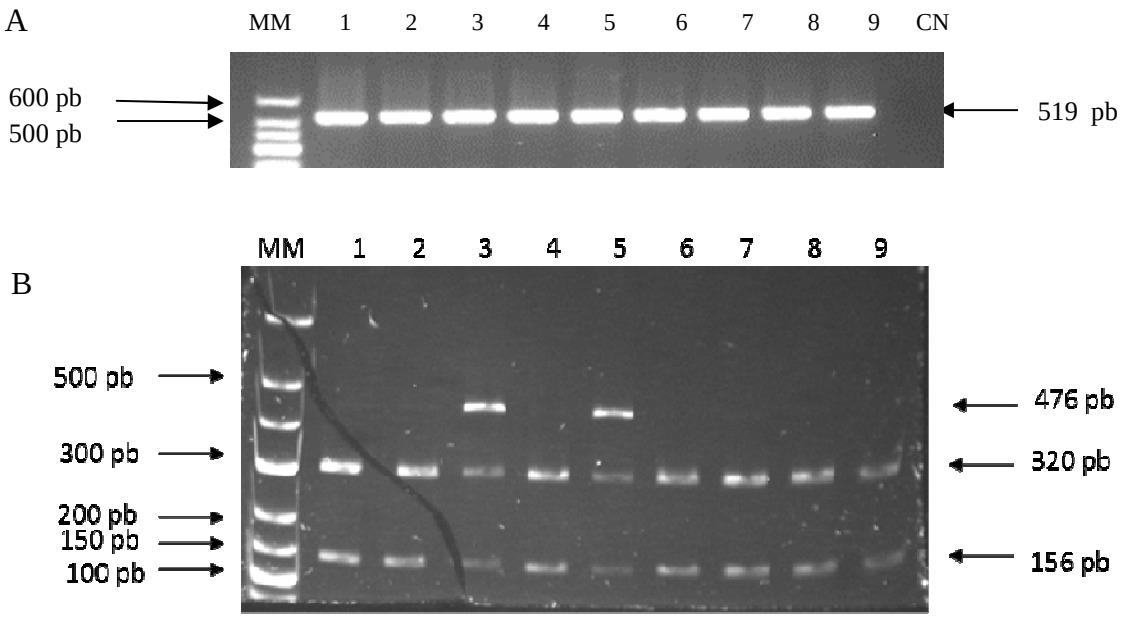


Figura 3- Estudo molecular por PCR-RFLP da Hb Maputo. A: Produtos de PCR para parte do gene *HBB*, éxons 1 e 2 visualizados em gel de agarose 1% . B: Restrição enzimática com *DpnII* realizada nos produtos de PCR da figura 1A visualizados em gel de poliacrilamida 12% corado com brometo de etídio. As amostras 3 e 5 são heterozigotas para a Hb Maputo, pois o gene mutado foi quebrado em fragmentos de 476 pb e 43 pb (este último não visualizado no gel). O gene beta selvagem é clivado em fragmentos de 320 pb, 156 pb e 43 pb (não visível no gel), pois existe um sítio adicional de restrição entre os fragmentos de 320 e 156 pb que é abolido pela mutação G>T. MM=marcador molecular; pb=pares de base; CN= controle negativo.

13- OUTROS ARTIGOS

Ainda serão redigidos mais dois artigos, um sobre as hemoglobinas variantes de cadeia alfa encontradas no presente estudo, principalmente sobre as hemoglobinas Ottawa, Stanleyville-II e St Luke`s que foram encontradas em associacao com a Hb S e uma revisão de literatura sobre hemoglobinas variantes incomuns.

14- CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS E CONCLUSÕES

A Hb Stanleyville-II é relativamente comum em Minas Gerais (incidência estimada de 1:11.500) e parece ter sido trazida pelos escravos africanos, uma vez que houve concentração dos casos na região mineradora do estado, região esta que concentrou os escravos vindos da África nos séculos XVII a XIX da história brasileira (Figura 7A). É possível que essa incidência seja ainda maior já que crianças com associação de outras hemoglobinas, como o caso em que foi encontrada a Hb Stanleyville-II associada à Hb C, não fizeram parte da população estudada por não possuírem o perfil eletroforético selecionado para inclusão na pesquisa.

As hemoglobinas Ottawa, Maputo, G-Ferrara, Hasharon, Etobicoke e St Luke's foram encontradas nas regiões de Minas Gerais assinaladas na Figura 7B. Não se nota concentração evidente de nenhuma delas em região particular do estado. Todas essas hemoglobinas, além da Hb Stanleyville-II, podem levar a falso diagnóstico de traço falciforme ou doença falciforme se apenas a focalização isoelétrica for utilizada na triagem neonatal. São necessários testes adicionais para o diagnóstico diferencial correto e análises moleculares para identificação da hemoglobina variante.

É bastante provável que outras hemoglobinas variantes de cadeia beta possam não ter sido detectadas pelo estudo devido ao ponto isoelétrico ser idêntico ao da Hb S e na IEF neonatal já terem sido rotuladas como “traço falciforme”. Os quatro casos detectados (dois de Hb Maputo e dois de Hb G-Ferrara) foram selecionados pela metodologia da pesquisa porque apresentavam padrão de IEF indeterminado ao nascimento e padrão semelhante ao da Hb S no sexto mês de vida. Reanalisando-se os géis dessas crianças, foi verificado pelos pesquisadores que, na verdade, ambas as hemoglobinas variantes eram um pouco mais “lentas” que a Hb S, mas a diferença era muito pequena e justificava a conduta que havia sido tomada na rotina do programa, qual seja, a de repetição do exame no sexto mês de vida.

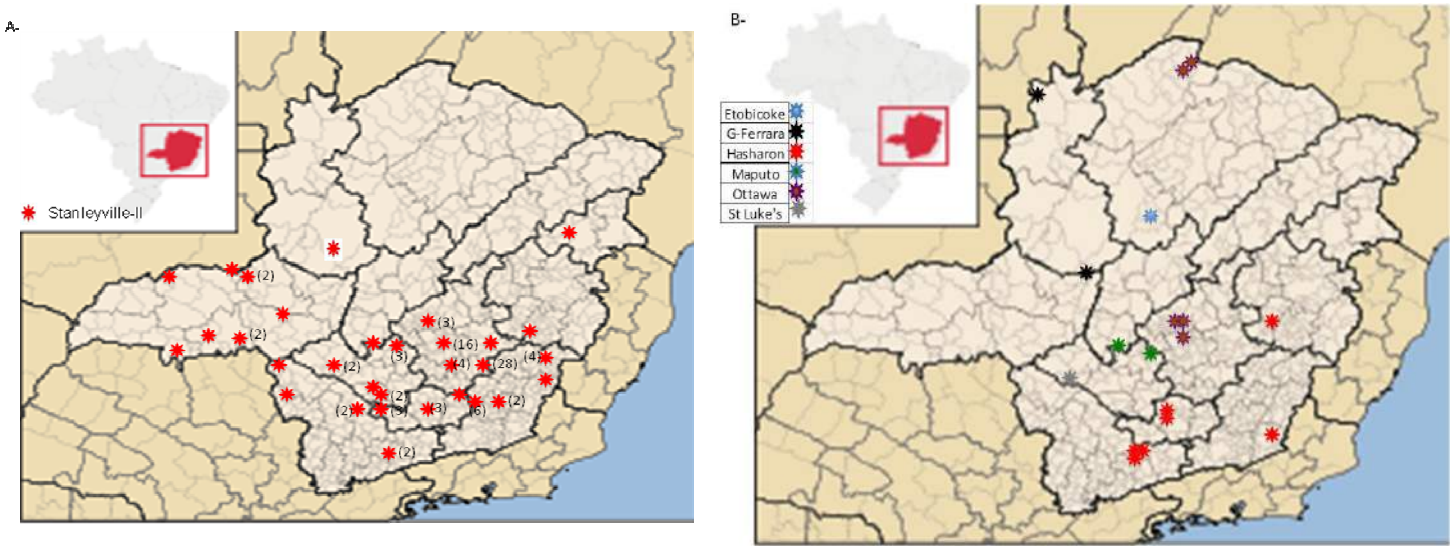


Figura 7- Distribuição geográfica das Hbs variantes com ponto isoelétrico semelhante ao da Hb S encontradas no presente estudo. A- Localização dos casos de Hb Stanleyville-II. Os números entre parênteses representam a quantidade de crianças diagnosticadas correspondentes a cada asterisco vermelho. B- Localização dos casos de Hb Maputo, G-Ferrara, St Luke's, Etobicoke, Ottawa e Hasharon. Cada criança diagnosticada corresponde a um asterisco cujas cores representam a hemoglobina variante encontrada (ver legenda interna à figura).

Não se encontrou evidência de relevância clínica das hemoglobinas de cadeia alfa detectadas nos presente estudo, mesmo nos casos em que houve associação de St Luke's e Stanleyville-II com a Hb S. Devido ao pequeno número de casos da presente casuística, não se pode afastar, entretanto, que outros autores venham a detectar alterações clínicas ou hematológicas decorrentes dessas Hbs variantes. No caso das hemoglobinas de cadeia beta, G-Ferrara e Maputo, também não foram detectadas manifestações clínicas da forma heterozigótica com o alelo normal A. De acordo com a literatura consultada, entretanto, a co-herança de Hb S com as hemoglobinas Maputo ou G-Ferrara pode levar a quadro de doença falciforme cuja gravidade é difícil de se avaliar pelo número exíguo de casos relatados (Marinucci *et al*., 1983; Canizares *et al*., 1983). Por isso, todas as famílias envolvidas com essas variantes receberam orientação genética pertinente.

A PCR-RFLP utilizando *AfeI e TaqI* realizada diretamente no produto da *gap-PCR* que detecta alfa-talassemia é simples, rápida e econômica, tornando desnecessário o sequenciamento de DNA, realizado para identificação dos dois primeiros casos de Hb Stanleyville-II e nos de Hbs Maputo, G-Ferrara, Ottawa, Etobicoke e St Luke's.

A associação de alfa talassemia do tipo 3.7 foi encontrada com as Hbs Hasharon, Stanleyville-II, Maputo e G-Ferrara. Nos casos da Hb Stanleyville-II foi possível comprovar estatisticamente que a hipocromia e microcitose são devidas à co-herança de α-talassemia e não devido à presença da Hb variante em si ($p < 0,05$ em todas as associações - ver anexo 16.8). A ausência co-herança com alfa talassemia foi constatada em cinco casos de Hb Stanleyville-II e em três destes havia relação de parentesco. Foi possível observar por métodos moleculares que as mutações correspondentes às Hbs Ottawa e St Luke's estavam localizadas no gene *HBA1*, a Hb Etobicoke no alelo híbrido *α212*, a Hb Hasharon no gene híbrido -$\alpha^{3.7}$ e a Stanleyville-II tanto no gene *HBA2* quanto no gene híbrido -$\alpha^{3.7}$.

Do total de 112 crianças estudadas, 51 haviam sido consideradas, pela IEF, como portadores de Hb indeterminada ao nascimento e de traço falciforme no sexto mês de vida. Todas nasceram nos primeiros seis anos do programa. Nos anos subsequentes, a partir da experiência adquirida, as crianças foram consideradas como portadoras de hemoglobinas “raras”, a serem investigadas, o que se materializou no presente estudo. Métodos moleculares são necessários para a identificação da variante. Atualmente no PTN-MG todos os casos suspeitos de doença falciforme são confirmados por testes moleculares utilizando-se PCR alelo-específica para o códon 6 selvagem, mutações da Hb C e S, além da mutação que gera a Hb D-Punjab.

A co-herança de mutações nas cadeias α ou γ e do alelo β^S ou β^C torna a leitura da IEF mais complexa. A comparação evolutiva dos géis ao nascimento e no 6º mês auxilia na correta interpretação, mas são necessárias atenção e experiência.

Para o estudo molecular de uma variante ainda desconhecida, a eletroforese de cadeia fornece a informação se a Hb variante é de cadeia alfa ou beta. Entretanto, é possível, na maioria dos casos, obter-se esse dado comparando-se o padrão de bandas na IEF ao nascimento com o do sexto mês de vida. No caso de variante de alfa, a fração que se observa entre as regiões de S e C ao nascimento desaparece no sexto mês em decorrência da diminuição acentuada da produção de cadeias γ. As variantes de cadeia β não possuem tal perfil. Inclusive, essa diferença de perfis encontrados nas variantes e

cadeia beta e alfa pode justificar a maior quantidade de Hbs variantes de cadeia alfa encontradas no presente estudo.

O estudo do gene alfa é bastante árduo devido à homologia acentuada entre os genes *HBA1* e *HBA2* e à elevada porcentagem de citosina e guanina presentes nas regiões não codificantes. Ainda mais trabalhoso foi o estudo do alelo híbrido *α212*, uma vez que o mesmo não era conhecido na população brasileira e os relatos internacionais são escassos (Gu et al., 1988; Law et al., 2006 . Esse gene parece ter sido resultado de um *crossover* desigual entre um cromossomo selvagem contendo os genes *HBA2* e *HBA1* e um cromossomo contendo o gene híbrido $-\alpha^{3.7}$. Pode ser que haja outros casos do gene híbrido *α212* devido ao grande número de casos de gene híbrido $-\alpha^{3.7}$ encontrados na população brasileira.

No presente estudo foi possível estabelecer PCR-RFLPs para detectar as Hbs St Luke's, Etobicoke, Ottawa, Stanleyville-II, Hasharon e Maputo. Na rotina da triagem neonatal, em caso de dúvida na leitura da IEF, a PCR alelo-específica para a Hb S é suficiente para se evitar falso diagnóstico de traço falciforme e é mais barata do que a técnica de restrição enzimática. Ela não identifica a hemoglobina variante, mas afasta o diagnóstico de traço ou doença falciforme. O teste de falcização, rotineiramente utilizado em laboratórios de hematologia para detectar a presença da Hb S, não pode ser usado na triagem, pois a amostra de sangue enviada ao Nupad é coletada em papel filtro. Além disso falso negativo em recém-nascido é a regra, pois a quantidade de Hb S é reduzida e a de Hb fetal é elevada.

O estudo envolveu 56 municípios de Minas Gerais. O fato de ser uma coleta de sangue total em tubo e a necessidade de envio da amostra para Belo Horizonte foram desafios para a pesquisa, mas foi possível a obtenção da maioria das amostras, pois a rotina do Setor de Controle de Tratamento do Nupad e seus contatos com as UBS de todo o estado facilitaram sobremaneira a tarefa. O envio das correspondências para as UBS contendo os resultados da pesquisa precisou ser feito com muita atenção uma vez que foram encontrados sete tipos diferentes de hemoglobinas variantes, podendo, ainda, serem associados com a alfa-talassemia e, em alguns casos, com a Hb S, o que fez aumentar o número de tipos de cartas para serem enviadas.

Como perspectiva futura, o estudo poderá ser completado com os casos de hemoglobina com perfil eletroforético semelhante ao da Hb S encontrados de julho de 2008 até a presente data. Outra possibilidade interessante é a pesquisa da relevância clínica e da distribuição geográfica das 1.637 hemoglobinas indeterminadas encontradas

pela triagem neonatal no período estudado. Essa definição é importante, pois existem várias crianças com Hb indeterminada que foram encaminhadas, pelo Nupad para acompanhamento médico na Fundação Hemominas. Muitas poderiam, com segurança, ter esse acompanhamento suspenso com a identificação precisa da variante. Outras teriam orientação genética dirigida para o tipo de manifestação clínica esperada. Em poucos casos, seria possível a descrição de novas variantes uma vez que é elevado o grau de miscigenação genética da população brasileira. Com certeza, seria contribuição relevante para o conhecimento internacional sobre essa importante proteína do ser humano.

Além disso, é possível, a partir dos resultados do presente estudo, o surgimento de uma nova linha de pesquisa na pós-graduação da Faculdade de Medicina da UFMG, que estudaria as hemoglobinas variantes incomuns que ocorrem em Minas Gerais.

Conclusões

1. A Hb Stanleyville-II é relativamente comum em Minas Gerais (incidência de 1:11.500);

2. A presença das hemoglobinas Stanleyville-II, Ottawa, Maputo, G-Ferrara, Hasharon, Etobicoke e St Luke's pode levar a falso diagnóstico de traço ou doença falciforme, esta última se a variante estiver em homozigose, necessitando-se de testes adicionais para o diagnóstico diferencial correto;

3. As hemoglobinas detectadas no presente estudo parecem não possuir relevância clínica, mesmo nos casos em que se detectou associação das variantes St Luke's, Stanleyville-II e Ottawa com a Hb S, e no caso da associação do gene híbrido *α212* com a Hb Etobicoke em heterozigose;

4. A Hb Rush em heterozigose acarreta hemólise discreta, mas esta pode acentuar-se em situações de estresse;

5. No presente estudo foram encontrados os primeiros casos no Brasil das hemoglobinas Ottawa, Maputo, G-Ferrara, , Etobicoke e St Luke's e do gene *α212*;

6. A hipocromia e microcitose observadas em várias crianças que possuem a Hb Stanleyville-II são devidas à co-herança de α-talassemia e não à presença da referida variante;

7. Apesar de não terem sido encontrados casos de associação das hemoglobinas Maputo e G-Ferrara com a Hb S, é preciso estar atento a esse fato, pois a co-herança dessas

mutações pode gerar quadro clínico semelhante ao da anemia falciforme;

8. A PCR-RFLP pôde ser utilizada como método diagnóstico para todas as hemoglobinas detectadas, com exceção da Hb G-Ferrara.

15- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DAS CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS E CONCLUSÕES

Canizares, M. E., G. Martinez, et al. [Hemoglobinopathy S with an interaction of HbS and Hb G-Ferrara]. Sangre 1983 28(6):770-4.

Gu YC, Nakatsuji T, Huisman TH. 1988. Detection of a new hybrid alpha 2 globin gene among American blacks. Hum Genet 79:68-72.

Law HY, Luo HY, Wang W, Ho JF, Najmabadi H, Ng IS, Steinberg MH, Chui DH, Chong SS. 2006. Determining the cause of patchwork HBA1 and HBA2 genes: recurrent gene conversion or crossing over fixation events. Haematologica 91:297-302.

Marinucci, M., J. P. Boissel, et al. Hemoglobin Maputo: a new beta-chain variant (alpha 2 beta 2 47 (CD6) Asp replaced by Tyr) in combination with hemoglobin S, identified by high performance liquid chromatography (HPLC). Hemoglobin 1983 7(5):423-33.

16 - ANEXOS

ANEXO 16.1 - Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa: "**Estudo genético de hemoglobinas variantes incomuns em crianças triadas pelo programa estadual de triagem neonatal de minas gerais (PETN-MG)".**

A maioria das pessoas apresenta a hemoglobina A nos glóbulos vermelhos (hemácias). Entretanto existem aquelas pessoas que possuem uma mutação no DNA e o resultado desta mutação é uma alteração da estrutura da hemoglobina normal resultando em uma hemoglobina diferente denominada variante ou rara. Existem no mundo cerca de 1037 hemoglobinas variantes, dentre elas a hemoglobina S, responsável pela anemia falciforme que é a doença hereditária mais comum no Brasil.

Já foram detectadas nos testes de triagem neonatal de Minas Gerais (teste do pezinho) várias variantes de hemoglobina. A maioria delas não é clinicamente significativa, entretanto existem diversas hemoglobinas variantes incomuns que possuem importância clínica e manifestação hematológica, e existem, pelo menos, cinco que são confundidas com a hemoglobina S, presente na doença falciforme. É necessário diferenciar a hemoglobina S dessas outras hemoglobinas com a finalidade de excluir a doença falciforme e de verificar sua importância clínica. Além disso, a identificação genética de hemoglobinas variantes incomuns é importante, pois pode evitar falso diagnóstico de doença falciforme, pode propiciar a identificação de hemoglobinas variantes que ocorrem em Minas Gerais, a verificação de relevância clínica de determinada hemoglobina, assim como a identificação de novas hemoglobinas variantes.

Para sua participação no estudo, será necessária a coleta de nova amostra de sangue em tubo de vidro para que seja feito o isolamento do DNA (ácido desoxiribonucléico) e análise deste.

O único desconforto existente para a participação na pesquisa consiste na retirada de sangue, procedimento que será realizado por profissionais treinados e qualificados. Raramente, pode ocorrer hematoma (mancha de sangue) no local de penetração da

agulha que se usa na coleta de sangue. Caso você apresente algum problema em seus exames, você será encaminhado(a) para consulta médica e aconselhamento.

Nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira será feito pela sua participação. Asseguramos que todos os dados obtidos são sigilosos e serão utilizados somente para esta pesquisa, não sendo armazenados para estudos futuros. Garantimos sua liberdade de retirar o presente consentimento em qualquer momento que desejar fazê-lo.

Eu, _____ (pai, mãe ou responsável) do menor _____, declaro que li (ou ouvi a leitura) e tive a oportunidade de ter as minhas dúvidas a respeito dessa pesquisa esclarecidas. Autorizo a minha participação e a coleta de sangue. Estou também ciente que não sou obrigado(a) a dar essa autorização e, se o faço, não me sinto coagido(a) a fazê-lo. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento e a não-autorização para realização dos procedimentos não trará nenhum prejuízo para mim ou minha família.

_____

_____

Assinatura

Local: _____ Data: ____/_____/_____

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP / UFMG
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa 2 – 2º andar - CEP 31.270-901 – BH / MG - Tel (31) 34094592 – coep@prpq.ufmg.br
Pesquisadora : Marcilene Rezende Silva– Tel (31) 9901-1590
Coordenador da Pesquisa: Dr. Marcos Borato Viana – Tel (31) 3409-9772/(31) 9202-3938

ANEXO 16.2 - Parecer do COEP-UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 163/08

Interessado(a): Prof. Marcos Borato Viana
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 7 de maio de 2008, o projeto de pesquisa intitulado **"Estudo genético de hemoglobinas variantes incomuns em crianças triadas pelo programa estadual de triagem neonatal de Minas Gerais (PETN-MG)"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Av. Pres. Antonio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II - 2° andar – Sala 2005 – Cep:31270-901 – BH-MG
Telefax: (031) 3409-4592 - e-mail: coep@prpq.ufmg.br

ANEXO 16.3 - Parecer do CEP da Fundação Hemominas

Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais

HEMOMINAS

Belo Horizonte, 04 de março de 2009

OFÍCIO Nº 15 / 2009
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FUNDAÇÃO HEMOMINAS

Prezado Senhor Pesquisador, Marcos Borato Viana

Encaminhamos o parecer consubstanciado referente ao seu projeto de pesquisa "Estudo genético de hemoglobinas variantes incomuns em crianças triadas pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PETN-MG)", nº de registro 221. Seu projeto foi aprovado por nosso Comitê, e então, a partir deste momento, sua pesquisa pode ser desenvolvida no âmbito da Fundação Hemominas. No entanto, solicitamos as seguintes modificações:

1- Alterar o TCLE, de modo que o texto seja referente ao responsável pela criança, e não à própria criança, uma vez que não é a criança que está dando o seu consentimento, e sim o seu responsável legal.

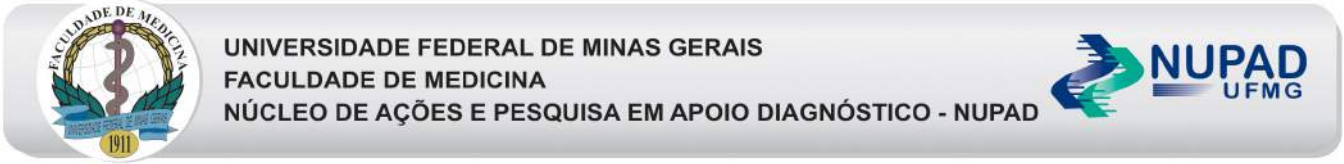
2- Alterar a folha de rosto, campo "Projeto multicêntrico". Foi assinalado que se trata de um projeto multicêntrico, mas este não o é. Segundo a CONEP, um projeto multicêntrico se aplica apenas se **um mesmo protocolo de pesquisa** for aplicado em vários centros. Solicitamos também que a folha de rosto seja gerada a partir do sistema SISNEP.

Desejamos boa sorte e sucesso em seu estudo.

Atenciosamente,

Marina Lobato Martins
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Hemominas

ANEXO 16. 4- Carta de orientação a unidade básica de saúde para coleta de sangue total



Belo Horizonte, de de

Ao Responsável pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal

Conforme informamos anteriormente, será necessária a coleta de nova amostra de algumas crianças, cuja análise dos resultados obtidos pelas técnicas de eletroforese por focalização isoelétrica (IEF) e análise do DNA por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), mostrou que o diagnóstico laboratorial é compatível com a presença da hemoglobina A em associação com uma hemoglobina "rara", com corrida eletroforética semelhante à da hemoglobina S (hemoglobina da doença falciforme). Em anexo, encaminhos a relação das crianças que deverão realizar a nova coleta.

Seguem algumas orientações a serem seguidas:

1-ORIENTAÇÕES GERAIS:

- Sempre use luvas para manusear o material.
- Coloque o gelo reciclável no mínimo 4 horas antes para congelar.

2-IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA:

Rotular o tubo com esparadrapo para não descolar e escrever o nome e o código da criança, data da coleta e horário, destacar que a amostra é para a **pesquisa da hemoglobina rara** com caneta esferográfica para não borrar

Exemplo: Maria Aparecida da Silva / COD.: WWW/1234

Data coleta: 12/01/99 Hora Coleta: 08:00 hs

Pesquisa hemoglobina rara

3-COLETA:

A coleta deverá ser de sangue venoso, em EDTA (aproximadamente 4,9 ml), e deverá ser realizada entre segunda e quarta-feira, preferencialmente na parte da manhã. Não é necessária a realização de jejum. NÃO PODE SER EM PAPEL FILTRO.

4-EMBALAGEM:

- Colocar o tubo dentro do plástico enviado, para melhor proteção de todos.
- Fixar o plástico contendo o tubo com sangue junto ao gelo reciclável com gominha.
- Colocar o tubo com o plástico em caixa de isopor bem acondicionado; se necessário, use papel picado ou amassado de forma a fixar bem o tubo dentro da caixa, evitando que fique solto.

- Fechar bem a caixa de isopor e colocar dentro da caixa de papelão. Fechar a caixa de papelão.
- Identificar o destinatário e o remetente com etiquetas. Favor não escrever na caixinha.

ATENÇÃO: Use somente o gelo reciclável enviado.

5-ENVIO:

O tubo contendo sangue coletado em EDTA deverá ser encaminhado ao NUPAD em caixa de isopor contendo gel de resfriamento (material em anexo), num prazo de até 24 horas após a coleta. Caso o envio não seja possível neste prazo, a amostra deverá ser mantida à temperatura de 4ºC até o seu envio no dia seguinte.

ENVIO POR CORREIO: Procure descobrir o horário de saída do malote na(s) agência(s) de correio para que o material não permaneça muito tempo descongelado.

ENVIO POR PORTADOR: Procure repassar a caixa com material no horário mais próximo de saída do portador. Recomende que a caixa não fique exposta ao sol ou sobre motores durante o transporte.

ENVIAR PARA O ENDEREÇO ABAIXO:

NUPAD - Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico

Faculdade de Medicina da UFMG- Av.Professor Alfredo Balena nº 190 -1º andar Sala: 107- CEP.: 30130-100 / Belo Horizonte /MG - Horário: 8:00 ás 18:00 hs.

Os resultados da análise serão encaminhados as Unidades de Saúde e aos pais posteriormente.

Desde já agradecemos pela colaboração e estamos à disposição para qualquer esclarecimento.

Em caso de dúvida, favor entrar em contato conosco pelos telefones: (31) 3409.8909 Daniela Dutra, ou 3409.9714 Fernanda

Atenciosamente,

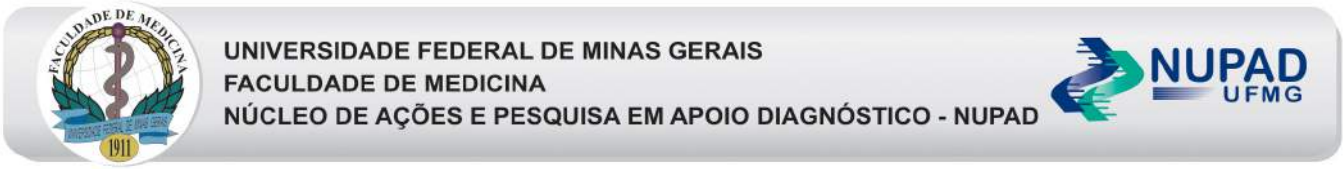
Dra. Ana Paula Pinheiro Chagas Fernandes

Supervisão Médica - Setor de Controle do Tratamento/NUPAD

Av. Alfredo Balena, 190 - 5º andar - Santa Efigênia - CEP: 30130-100 - Belo Horizonte - Minas Gerais

Fone: (31) 3409-8900 - Fax: (31) 3409-8917 - E-mail: nupad@medicina.ufmg.br - Site: www.nupad.medicina.ufmg.br

ANEXO 16.5 – Exemplo de carta aos pais explicando o porquê da necessidade de nova coleta de sangue total



Belo Horizonte, de de

Senhores pais ou responsáveis pela criança _____

Comunicamos que a análise dos resultados obtidos pelas técnicas de eletroforese por focalização isoelétrica (IEF) e análise do DNA por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), na amostra da criança , código **,** coletada em , confirmou que o diagnóstico laboratorial é compatível com a presença da hemoglobina A em associação com outra HEMOGLOBINA "RARA" que poderia ser confundida com a hemoglobina S (da doença falciforme), mas que se comprovou, com certeza, NÃO SER HEMOGLOBINA S.

Esse achado confirma o resultado encontrado no "Teste do Pezinho" realizado ao nascimento da criança. No entanto, para identificar corretamente a hemoglobina "rara", é necessária a coleta de uma nova amostra de sangue venoso, em anticoagulante (EDTA), para realização da análise do DNA através de sequenciamento gênico.

O sequenciamento gênico é uma técnica de alta precisão que irá definir qual é a hemoglobina "rara" que não foi identificada pelas técnicas já utilizadas, sendo essa definição muito importante para a conclusão do diagnóstico da criança.

Desde já, agradecemos pela colaboração, que muito está contribuindo com os avanços dos métodos de diagnóstico das doenças das hemoglobinas e que garante a qualidade na realização dos futuros "Testes do Pezinho".

Uma cópia desta carta também foi enviada à sua Unidade de Saúde para que ela saiba que você irá procurá-la. Faça isso o mais rapidamente possível.

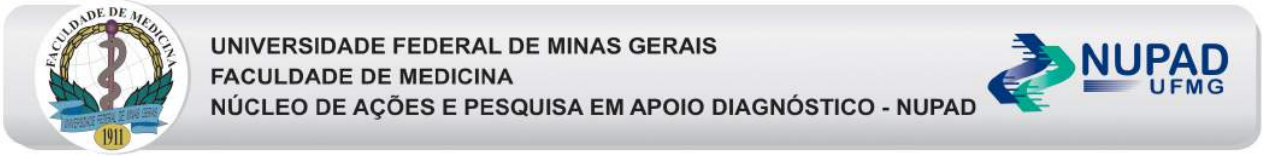
Estamos à disposição para qualquer esclarecimento. 0800-7226500.

Atenciosamente,

Dra. Ana Paula Pinheiro Chagas Fernandes- Supervisão Médica - Setor de Controle do Tratamento/NUPAD

Av. Alfredo Balena, 190 - 5º andar - Santa Efigênia - CEP: 30130-100 – BH-- MG
Fone: (31) 3409-8900 - Fax: (31) 3409-8917 - E-mail: nupad@medicina.ufmg.br - Site: www.nupad.medicina.ufmg.br

ANEXO 16.6 - Exemplo de carta de retorno da pesquisa para a unidade básica de saúde



Belo Horizonte, de de

Ao Responsável pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal,

Comunicamos que após os diversos estudos já realizados, a análise final do exame para hemoglobinas da criança _____, código _____, mostrou a presença da hemoglobina A (“normal”) associada a uma hemoglobina variante “rara” denominada Stanleyvile-II e à alfa talassemia.

A Stanleyville-II é uma hemoglobina variante que pode ser confundida com a hemoglobina S, pois ambas apresentam comportamento eletroforético muito semelhante, pela eletroforese de hemoglobinas - um dos métodos utilizados para fazer o diagnóstico das doenças das hemoglobinas. Isso justificou a necessidade da repetição do exame da criança ao nascimento, quando o primeiro resultado do “teste do pezinho” foi indeterminado (Ind) e o do 6º mês de vida foi compatível com portador de traço falciforme (Hb AS).

O diagnóstico laboratorial da criança é na realidade Hb A/ Stanleyville-II, em associação com alfa talassemia.Este achado não traz alterações clínicas importantes para a criança, a não ser a possibilidade de uma leve anemia, com a presença no sangue de glóbulos vermelhos menores (microcitose) e um pouco mais “pálidos” (hipocromia) do que o normal, decorrentes da alfa talassemia. Portanto, não há motivos para preocupação. A criança deverá manter o seu acompanhamento de rotina com o pediatra.

Desde já, agradecemos pela colaboração, que muito contribuiu com os avanços dos métodos de diagnóstico das doenças das hemoglobinas, garantindo melhorias da qualidade na realização dos futuros “Testes do Pezinho”.

Qualquer dúvida ou esclarecimento estamos à disposição nos telefones:

0800-722.6500 Chemob-MG Atende

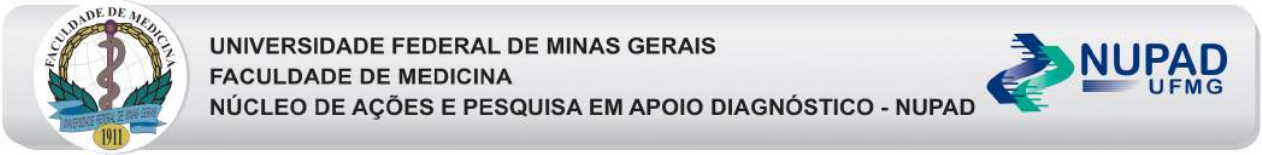
(31) 3409-8912 falar com Marcilene ou Isabela as terças-feiras (manhã) e sextas-feiras (tarde) ou (31) 3409.8907 falar com Juliana

Atenciosamente,

Dra. Ana Paula Pinheiro Chagas Fernandes

Supervisão Médica- Setor de Controle do Tratamento/NUPAD

ANEXO 16.7 - Exemplo de carta de retorno da pesquisa para os pais



Belo Horizonte, de de

Senhores pais ou responsáveis pela criança _____

Comunicamos que após os diversos estudos já realizados, a análise final do exame para hemoglobinas do seu filho, mostrou a presença da hemoglobina A ("normal") associada a uma hemoglobina variante "rara" denominada Stanleyvile-II e à alfa talassemia.

A Stanleyville-II é uma hemoglobina variante que pode ser confundida com a hemoglobina S, pois ambas apresentam comportamento eletroforético muito semelhante, pela eletroforese de hemoglobinas - um dos métodos utilizados para fazer o diagnóstico das doenças das hemoglobinas. Isso justificou a necessidade da repetição do exame do seu filho ao nascimento, quando o primeiro resultado do "teste do pezinho" foi indeterminado (Ind) e o do 6º mês de vida foi compatível com portador de traço falciforme (Hb AS).

O diagnóstico laboratorial do seu filho é na realidade Hb A/ Stanleyville-II, em associação com alfa talassemia.

Este achado não traz alterações clínicas importantes para a criança, a não ser a possibilidade de uma leve anemia, com a presença no sangue de glóbulos vermelhos menores (microcitose) e um pouco mais "pálidos" (hipocromia) do que o normal, decorrentes da alfa talassemia.

Portanto, não há motivos para preocupação. A criança deverá manter o seu acompanhamento de rotina com o pediatra.

Desde já, agradecemos pela colaboração, que muito contribuiu com os avanços dos métodos de diagnóstico das doenças das hemoglobinas, garantindo melhorias da qualidade na realização dos futuros "Testes do Pezinho".

Qualquer dúvida ou esclarecimento estamos à disposição nos telefones:

0800-722.6500 Chemob-MG Atende

(31) 3409-8912 falar com Marcilene ou Isabela as terças-feiras (manhã) e sextas-feiras (tarde) ou (31) 3409.8907 falar com Juliana

Atenciosamente,

Dra. Ana Paula Pinheiro Chagas Fernandes

Supervisão Médica- Setor de Controle do Tratamento/NUPAD

ANEXO 16.8- Média dos valores hematológicos das crianças com Hb Stanleyville-II que foram atendidas em consulta médica

Alfa talassemia	Hb (g/dL)	VCM (fL)	HCM (pg)
$\alpha^{Stanleyville}\alpha/\alpha\alpha$ (grupo A; n = 3)	13.0	83.3	28.5
$\alpha\alpha/-\alpha^{3.7;Stanleyville}$ (grupo B; n =23)	12.7	79.1	26.4
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7;Stanleyville}$ (grupo C; n = 3)	11.9	68.5	22.2

Usando o teste *post hoc* de Bonferroni não há diferença significativa nas médias das concentrações de Hb entre os grupos; a média do volume corpuscular médio (VCM) é estatisticamente significativa entre os grupos (A *vs.* B, p = 0.018, A *vs*. C, p <0.001, B *vs.* C, p <0.001) e a média da hemoglobina corpuscular média (HCM) também é estatisticamente significativa entre os grupos (A *vs.* B, p = 0.001, A *vs.* C, p <0.001, B *vs*. C, p <0.001).

ANEXO 16.9- Cópia da ata de defesa de tese

FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br

UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de **MARCILENE REZENDE SILVA** nº de registro 2008653450. Ás nove horas, do dia **três de maio de dois mil e doze**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de tese indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"ESTUDO GENÉTICO DE HEMOGLOBINAS COM MOBILIDADE ELETROFORÉTICA SEMELHANTE À DA HEMOGLOBINA S EM CRIANÇAS DO PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS"**, requisito final para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências da Saúde: Saúde da Criança e do Adolescente, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Saúde da Criança e do Adolescente. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Marcos Borato Viana, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Marcos Borato Viana - Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: APROVADA
Prof. Alvaro José Romanha - Coorientador	Instituição: FIOCRUZ	Indicação: APROVADA
Profª. Benigna Maria de Oliveira	Instituição: UFMG	Indicação: APROVADA
Profª. Ana Cristina Simões e Silva	Instituição: UFMG	Indicação: APROVADA
Profª. Maria de Fátima Sonati	Instituição: UNICAMP	Indicação: APROVADA
Dr. Adérson da Silva Araújo	Instituição: HEMOPE	Indicação: APROVADO

Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 03 de maio de 2012.

Prof. Marcos Borato Viana / Orientador _____

Prof. Álvaro José Romanha _____

Profª. Benigna Maria de Oliveira _____

Profª. Ana Cristina Simões e Silva _____

Profª. Maria de Fátima Sonati _____

Dr. Adérson da Silva Araújo _____

Profa. Ana Cristina Simões e Silva /Coordenadora _____

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Profa. Ana Cristina Simões e Silva
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Saúde da Criança e do Adolescente
Faculdade de Medicina/UFMG

CONFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG

16.10- Cópia da declaração de aprovação de defesa de tese

FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br

UFMG

DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores: Marcos Borato Viana, Álvaro José Romanha, Benigna Maria de Oliveira, Ana Cristina Simões e Silva, Maria de Fátima Sonati e Aderson da Silva Araújo aprovou a tese de doutorado intitulada: "**ESTUDO GENÉTICO DE HEMOGLOBINAS COM MOBILIDADE ELETROFORÉTICA SEMELHANTE À DA HEMOGLOBINA S EM CRIANÇAS DO PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS**" apresentada pela Doutoranda **MARCILENE REZENDE SILVA** para obtenção do título de doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 03 de maio de 2012.

Prof. Marcos Borato Viana

Prof. Álvaro José Romanha

Profª. Benigna Maria de Oliveira

Profª. Ana Cristina Simões e Silva

Profª. Maria de Fátima Sonati

Dr.. Adérson da Silva Araújo

17 - APÊNDICES

Várias figuras incluídas nesta seção fazem ou farão parte de artigos a serem publicados em periódicos científicos baseados nos resultados da presente tese.

APÊNDICE 17.1 - Resultados das eletroforeses de hemoglobina

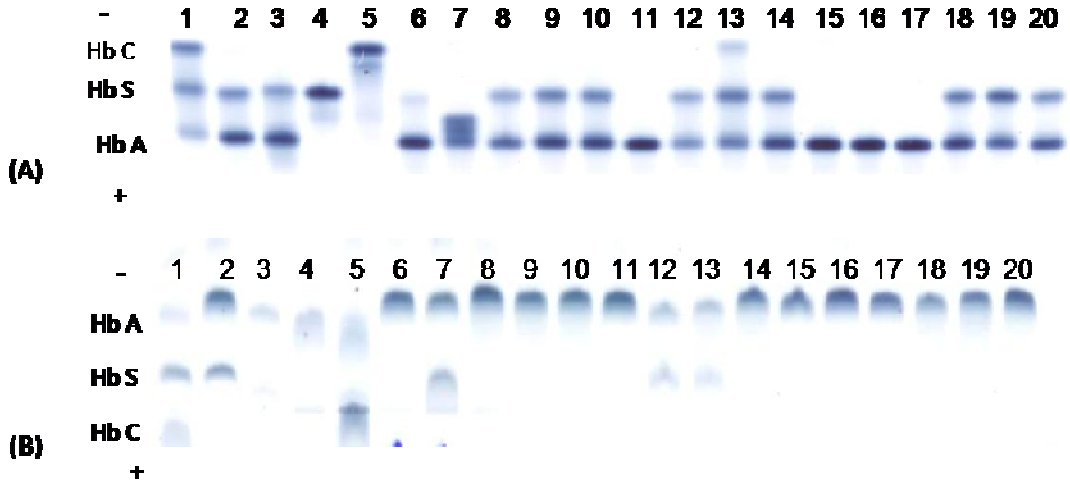


Figura 1- Eletroforeses de hemoglobina em pH alcalino (A) e ácido (B). As amostras de números 3, 8, 9, 10, 14, 18, 19 e 20 provêm de crianças heterozigotas para a Hb Stanleyville-II. Em pH alcalino essa Hb corre na posição da Hb S e em pH ácido na posição da Hb A. A amostra de número 4 provém da mãe de uma criança heterozigota para Stanleyville-II e possui essa Hb variante em homozigose. As amostras de números 11 e 15 indicam mães com Hb AA das crianças com amostras nas canaletas 10 e 14, respectivamente. A amostra de número 13 provém de criança com Hb S e Hb Stanleyville-II concomitantemente, sendo que a fração situada na posição da Hb C representa o dímero $\alpha^{Stanl}\beta^{S}$. A amostra 12 provém da mãe dessa criança, a qual é portadora de traço falciforme (AS), sem a Hb Stanleyville-II. A amostra 7 indica um indivíduo heterozigoto para a Hb Rush. Esta Hb corre como duas bandas distintas na região de Hb Fetal em pH alcalino. No pH ácido ela corre como uma única banda na região entre S e C. A amostra 1 representa o controle ASC.

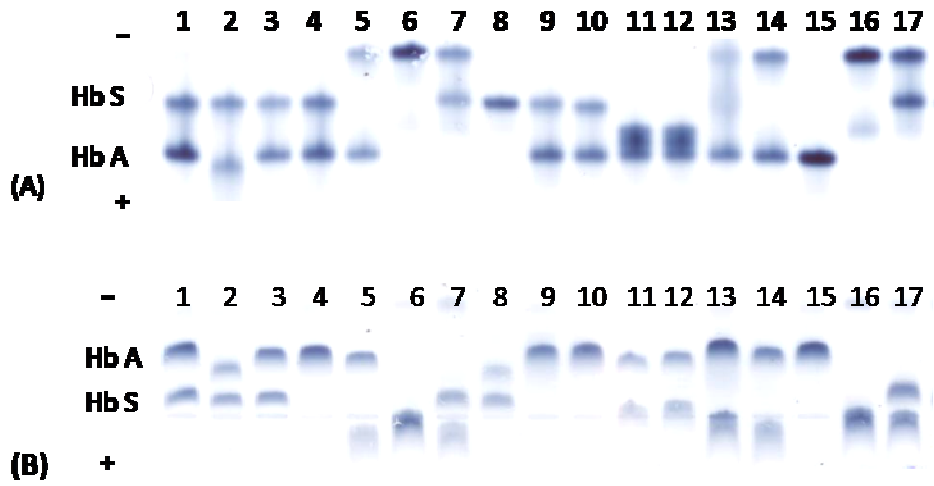


Figura 2- Eletroforeses de hemoglobina em pH alcalino (A) e ácido (B). A amostra 10 provém de criança heterozigota para a Hb Maputo; a amostra 9 provém de sua mãe, também heterozigota para essa variante. A Hb Maputo corre como a Hb S em meio alcalino e como a Hb A em meio ácido. As amostras 11 e 12 provêm de pacientes com Hb Rush, já descrita na Figura 1. A amostra número 1 representa o controle AS.

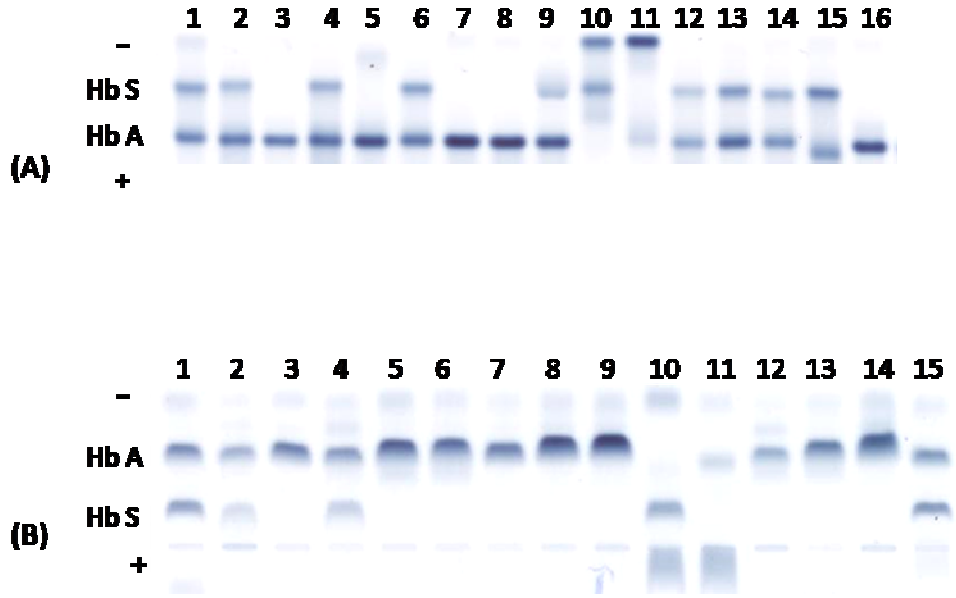


Figura 3- Eletroforeses de hemoglobina em pH alcalino (A) e ácido (B). A amostra 1 indica indivíduo controle AS e a amostra 9, indivíduo heterozigoto para a Hb Etobicoke. Essa Hb tem corrida eletroforética na região da Hb S em meio alcalino e na região da Hb A em meio ácido.

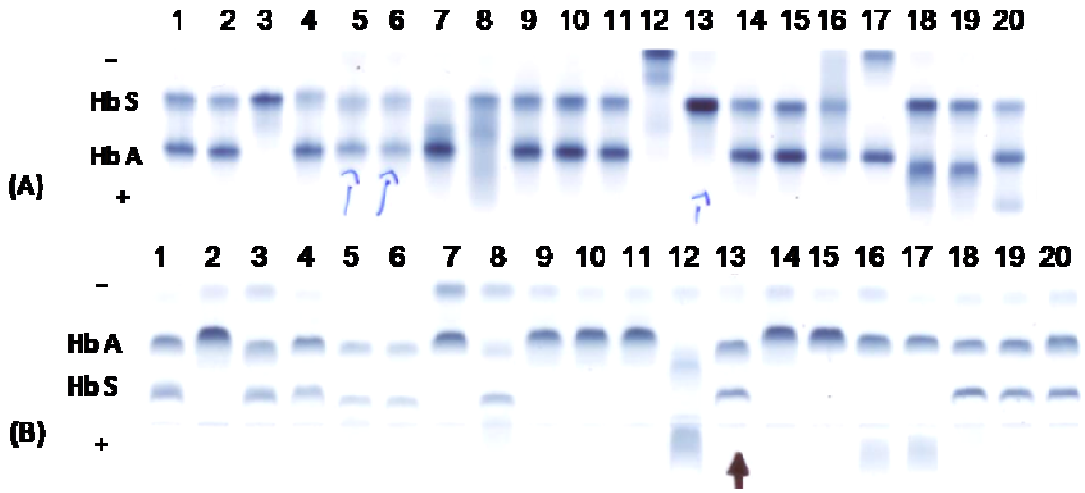


Figura 4- Eletroforeses de hemoglobina em pH alcalino (A) e ácido (B). A amostra 1 provém de indivíduo controle AS. As amostras de números 5 e 6 indicam pessoas, mãe e filho respectivamente, portadoras da Hb St. Luke's e da Hb S, concomitantemente. A Hb St. Luke's corre eletroforeticamente como Hb S em meio alcalino e como Hb A em meio ácido.

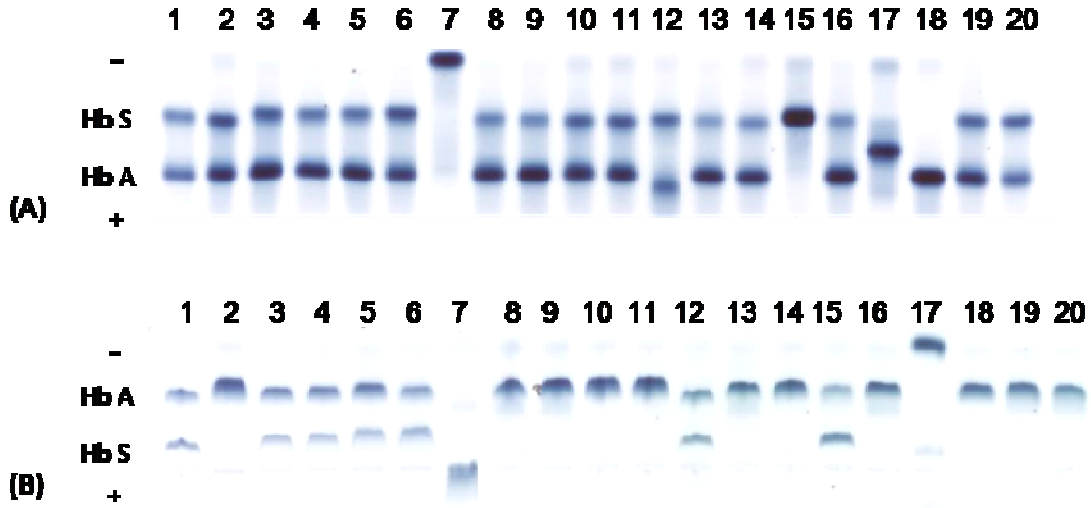


Figura 5- Eletroforeses de hemoglobina em pH alcalino (A) e ácido (B). O indivíduo amostrado na canaleta 1 é o controle AS. Os indivíduos cujas amostras estão nas canaletas 3, 4 e 5 são portadores da Hb Hasharon; 3 e 5 são crianças do estudo e 4 é pai da criança de amostra 3. A Hb Hasharon tem corrida eletroforética semelhante à da Hb S tanto no pH básico como no ácido. As pessoas cujas amostras estão nas canaletas 13 e 16 são heterozigotas para a Hb Ottawa; a de número 13 proveio de uma das crianças do estudo e a 16, de sua mãe. Essa Hb corre como Hb S em pH alcalino e como Hb A em pH ácido. O indivíduo 14 é heterozigoto para a Hb G-Ferrara , a qual possui eletroforese

semelhante à da Hb S em meio alcalino e semelhante à da Hb A em meio ácido. A amostra 15 é da mãe do indivíduo 14.

Apêndice 17.2 - Eletroforese de cadeias globínicas

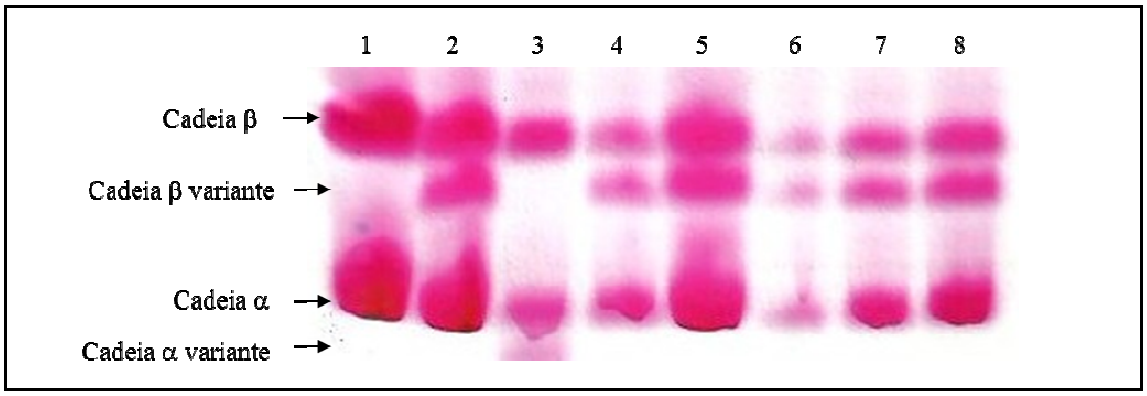


Figura 1- Eletroforese de cadeia globínica. As amostras 1 e 2 são controles, sendo a de número1 controle Hb A (cadeias β e α selvagens) e a de número 2 controle Hb AS (cadeia β variante e cadeia α selvagem). A amostra 3 pertence a um indivíduo portador de Hb com mutação no gene alfa da globina, pois possui cadeia α variante e β selvagem. As amostras 4 a 8 pertencem a portadores de Hb com mutação no gene beta da globina, uma vez que nessas amostras se visualizam cadeias β variantes e α selvagens.

Apêndice 17.3 - Produtos de PCR e PCR-RFLP realizados para detectar as Hbs variantes

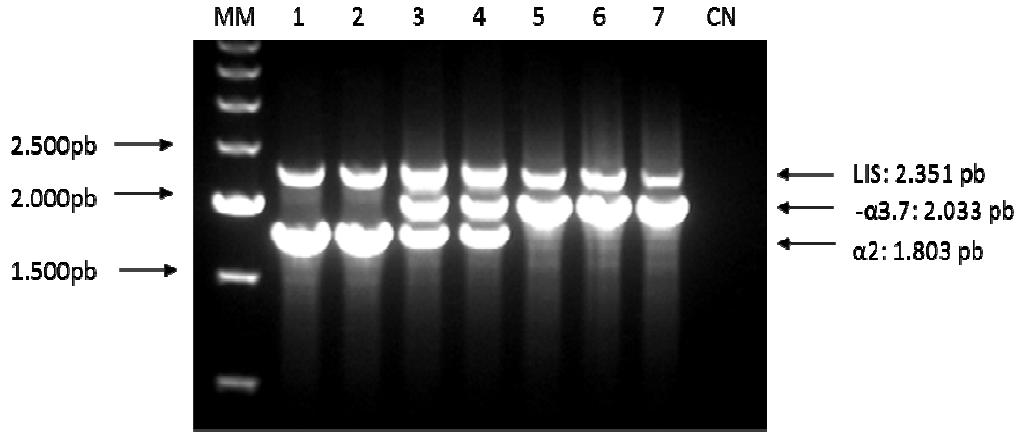


Figura 1- Produtos de *gap-PCR* multiplex para a detecção de alfa-talassemia 3.7. Os indivíduos representados nas canaletas 1 e 2 não possuem a deleção 3.7, pois apresentam apenas os fragmentos de 2.351 pb (gene LIS) e de 1.803 pb (*HBA2* selvagem). Os indivíduos mostrados nas canaletas 3 e 4 possuem essa deleção em heterozigose, pois além dos fragmentos de 2.351 pb e de 1.803 pb, aparece também o fragmento de 2.033 pb, indicativo da deleção $-\alpha^{3.7}$. Já as amostras 5, 6 e 7 são homozigotas para a α talassemia 3.7, uma vez que se visualizam apenas os fragmentos de 2.351 pb e de 2.033 pb. O gene LIS foi incluído na PCR como controle positivo da reação. MM=marcador molecular; pb=pares de bases; CN=controle negativo. Gel de agarose 1%.

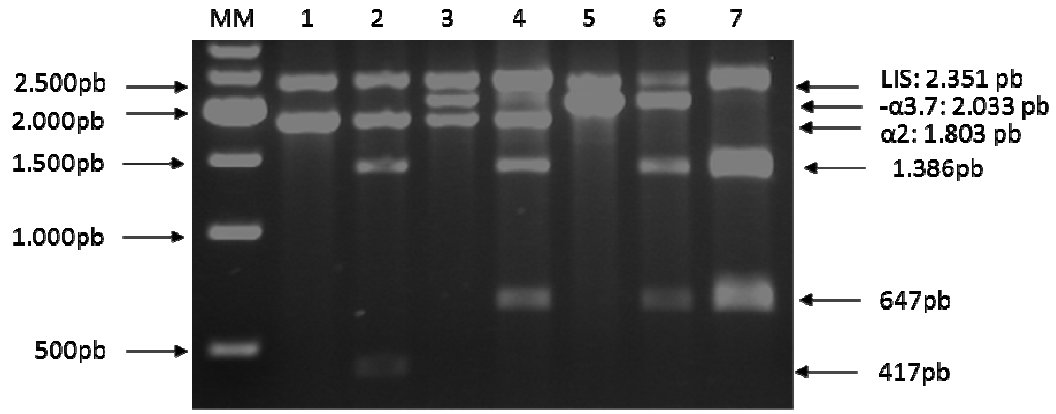


Figura 2- Produtos de *gap-PCR* multiplex (Figura 1) restringidos com a enzima AfeI para a detecção da mutação da Hb Stanleyville-II. As amostras 1, 3 e 5 não possuem essa Hb variante, pois nenhum de seus fragmentos amplificados na *gap-PCR* multiplex foi clivado. O indivíduo correspondente à canaleta 2 possui Stanleyville-II em heterozigose num dos fragmentos de *HBA2* normal (1.803 pb), o qual foi restringido em outros dois de tamanhos 1.386 pb e 417 pb. As crianças correspondentes às canaletas 4 e 6 apresentam Stanleyville-II em heterozigose no fragmento híbrido (2.033 pb) que foi clivado em 1.386 pb e 647 pb. O indivíduo 4 é heterozigoto para a deleção $-\alpha^{3.7}$ (possui o fragmento de *HBA2* normal: 1.803 pb), enquanto o indivíduo 6 é homozigoto para a mesma deleção (um de seus fragmentos híbridos de 2.033 pb não sofreu restrição). A canaleta 7 demonstra uma criança homozigota para a deleção $-\alpha^{3.7}$ e homozigota para Stanleyville-II, uma vez que seus dois fragmentos híbridos (2.033 pb) foram clivados em 1.386 pb e 647 pb. O gene LIS não possui sítio de restrição para a enzima AfeI. MM=marcador molecular; pb=pares de bases. Gel de agarose 1%.

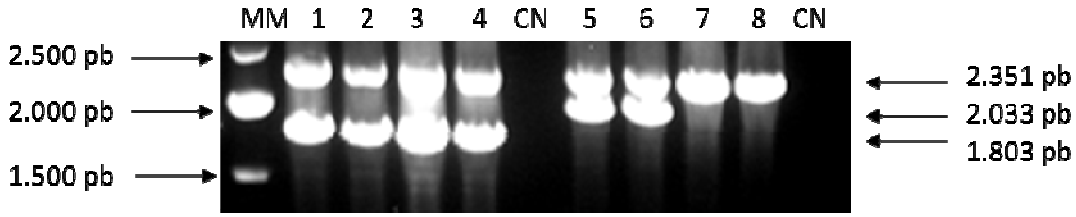


Figura 3- Produtos de *gap-PCR* biplex. As canaletas 1 a 4 apresentam amplicons derivados dos genes *HBA2* selvagem (1.803 pb) e LIS (2.351 pb). As canaletas de 5 a 8 demonstram produtos amplificados de LIS e gene alfa com deleção 3.7 (2.033 pb). Os indivíduos representados nas canaletas 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, além de 4 e 8, são os mesmos com seus respectivos genes amplificados separadamente. Dessa forma, as duas primeiras crianças amostradas são heterozigotas para a deleção alfa 3.7 e as duas últimas não possuem tal deleção. MM=marcador molecular; pb= pares de base; CN= controle negativo. Gel de agarose 1%.

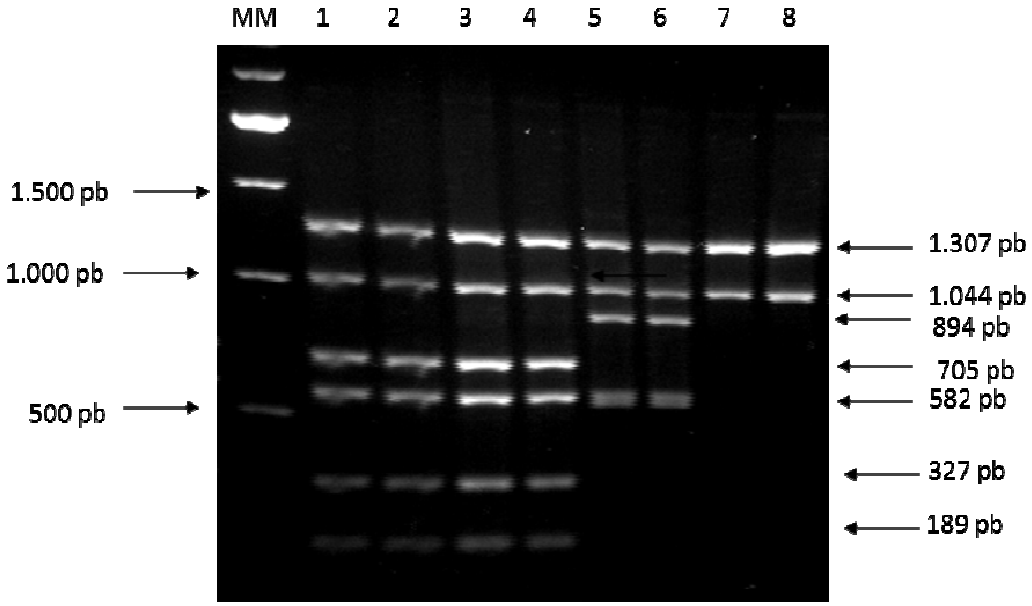


Figura 4- Produtos de *gap-PCR* biplex (Figura 3) digeridos com TaqI para a detecção da mutação correspondente à Hb Hasharon (os mesmos quatro indivíduos da Figura 3, na mesma disposição, 1 e 5; 2 e 6; 3 e 7; 4 e 8). As amostras 1 a 4 indicam produtos de restrição enzimática para os genes LIS (2.351 pb) e *HBA2* normal (1.803 pb). Nenhum dos quatro indivíduos possui mutação Hasharon no gene *HBA2* normal, pois os fragmentos de 705 pb, 582 pb, 327 pb e 189 pb são produtos de restrição enzimática de *H*BA2 selvagem. O gene LIS possui apenas um sítio de restrição para a enzima TaqI,

sendo clivado em 1.307 pb e 1.044 pb. As canaletas 5 a 8 demonstram fragmentos de restrição enzimática provenientes dos genes LIS e -$\alpha^{3.7}$ (2.033 pb) , o qual foi quebrado em outros de tamanhos 894 pb, 582 pb e 557 pb nas canaletas 5 e 6, sendo o fragmento de 894 pb exclusivo de quem tem a mutação que codifica a Hb Hasharon. No gene híbrido selvagem obtêm-se quatro fragmentos (705, 582, 557 e 189 pb), pois neste existe um sítio TaqI adicional entre os fragmentos de 705 e 189 pb que é abolido quando existe a mutação Hasharon G>C. Assim, as duas primeiras crianças apresentam Hb Hasharon em heterozigose presente no gene híbrido -$\alpha^{3.7}$ e as duas últimas não possuem essa hemoglobina variante, nem alfa-talassemia do tipo 3.7. MM= marcador molecular; pb=pares de bases. Gel de agarose 1%.

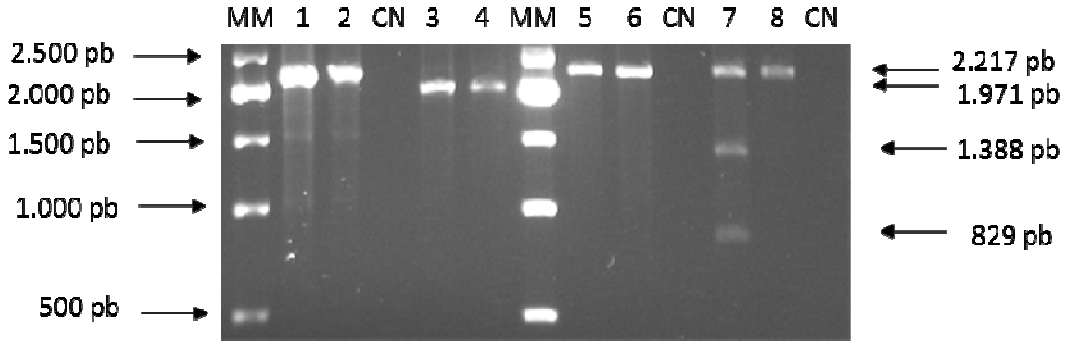


Figura 5- Produtos de PCR do gene *HBA1* (2.213 pb – canaletas 1 e 2). As canaletas 3 e 4 correspondem aos produtos de restrição enzimática com Bsu36I das amostras 1 e 2, respectivamente. O fragmento de 2.213 pb foi clivado em 1.971 pb e 242 pb (não visualizado), mas mostra ausência da mutação correspondente a Hb Etobicoke em *HBA1*, pois se estivesse presente tal mutação, haveria três fragmentos de 1.396, 575 e 242 pb. Os produtos de PCR do gene *HBA2* (2.217 pb) estão nas canaletas 5 e 6. Apenas a criança com amostra de PCR na canaleta 5 e amostra de restrição na canaleta 7 apresenta a Hb Etobicoke, a qual em seu sítio de restrição para a enzima Bsu36I tem o fragmento de *HBA2* mutado clivado em outros dois de tamanhos 1.388 e 829 pb. O gene a *HBA1* selvagem não possui sítio de restrição para essa enzima. MM=marcador molecular; pb=pares de bases; CN= controle negativo. Gel de agarose 1%.

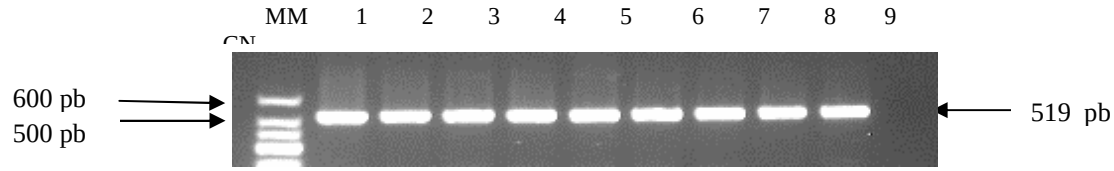


Figura 6- Produtos de PCR para parte do gene *HBB*, éxons 1 e 2 (519 pb – amostras 1 a 9). MM=marcador molecular; pb= pares de bases; CN= controle negativo. Gel de agarose 1%.

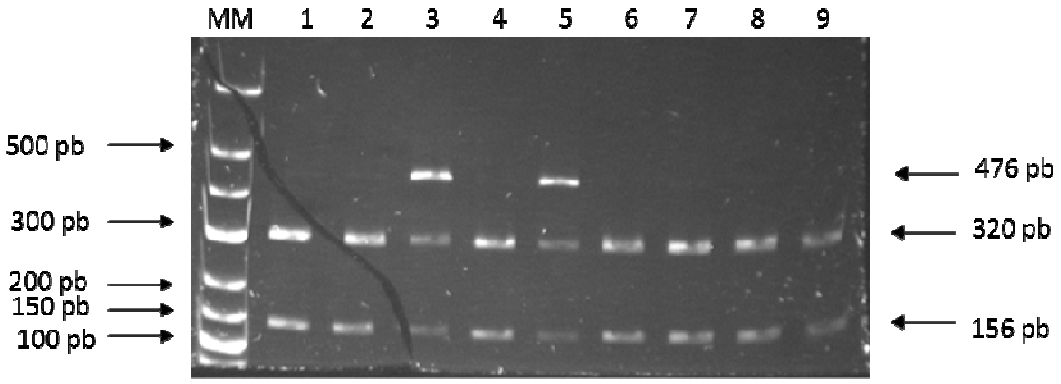


Figura 7- Produtos de restrição enzimática de parte do gene beta, éxons 1 e 2 (519 pb; ver Figura 6). As amostras 3 e 5 são heterozigotas para a Hb Maputo, pois o gene mutado foi quebrado em fragmentos de 476 pb e 43 pb (este último não visualizado no gel). O gene beta selvagem é clivado em fragmentos de 320 pb, 156 pb e 43 pb (não visível no gel), pois existe um sítio adicional de restrição entre os fragmentos de 320 e 156 pb (320+156=476) que é abolido pela mutação G>T. MM=marcador molecular; pb=pares de base. Gel de poliacrilamida 12% corado com brometo de etídio.

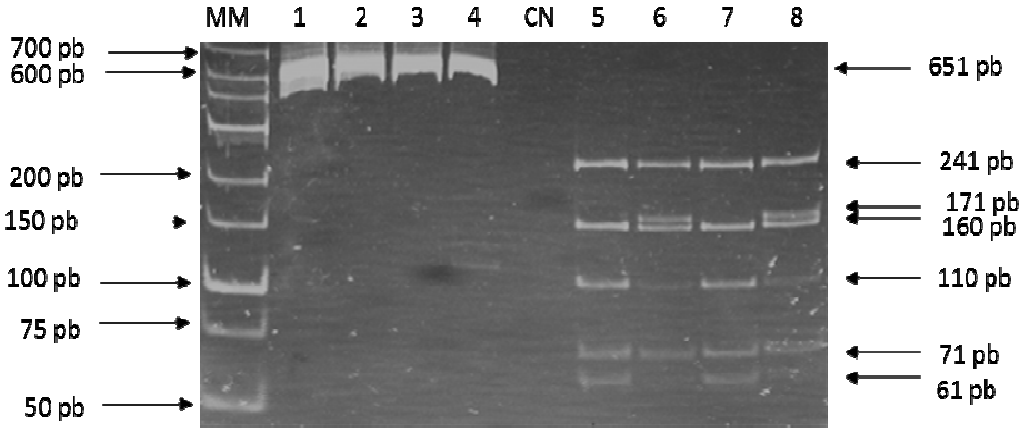


Figura 8- Produtos de PCR do éxon 3 do gene *HBA1* (651 pb) digeridos com a endonuclease de restrição NlaIV para a detecção de Hb St. Luke's. As amostras de 1 a 4 (produtos de PCR) têm seus correspondentes em ordem crescente e respectiva de restrição nas canaletas de 5 a 8. Assim, somente a segunda e a quarta crianças apresentam essa variante em heterozigose, pois um de seus fragmentos *HBA1* foi quebrado em 241 pb, 171 pb, 160 pb, 71 pb e 8 pb (não visível no gel). O fragmento selvagem é clivado em 241 pb, 160 pb, 110 pb, 71 pb, 61 pb e 8 pb (não visível no gel), pois nele existe um sítio de restrição adicional entre os fragmentos de 110 e 61 pb (110+61=171 pb), abolido pela mutação St. Luke's C>G. MM= marcador molecular; pb= pares de base; CN= controle negativo. Gel de poliacrilamida 12% corado com brometo de etídio.

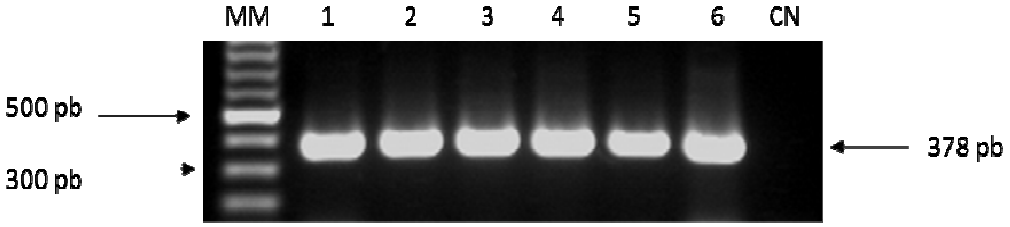


Figura 9- Produtos de PCR do éxon 1 do gene *HBA1* (378 pb). Os produtos de PCR estão amostrados nas canaletas de 1 a 6. MM= marcador molecular; pb= pares de base; CN= controle negativo. Gel de poliacrilamida 12% corado com brometo de etídio.

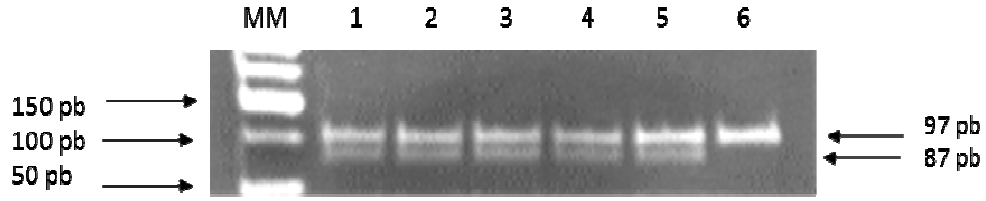


Figura 10- Produtos de restrição enzimática das amostras da figura 9 digeridos com a endonuclease BsaJI para a detecção da Hb Ottawa. O gene *HBA1* mutado é clivado em nove fragmentos: 97 pb, 87 pb, 50 pb, 35 pb, 34 pb, 29 pb, 22 pb, 13 pb e 11 pb. O gene *HBA1* selvagem (378 pb) é, por sua vez, clivado em dez fragmentos: 97 pb, 50 pb, 45 pb, 42 pb, 35 pb, 34 pb, 29 pb, 22 pb, 13 pb e 11 pb, pois possui um sítio adicional de restrição entre os fragmentos de 45 e 42 pb (45+42=87 pb), abolido pela mutação Ottawa G>C. Para simplificar a figura, apenas o segmento do gel que faz a distinção dos dois alelos está representado. As crianças de 1 a 5 apresentam essa variante em heterozigose; apenas a criança 6 não apresenta essa variante. MM=marcador molecular; pb=pares de base; CN=controle negativo. Gel de poliacrilamida 12% corado com brometo de etídio.

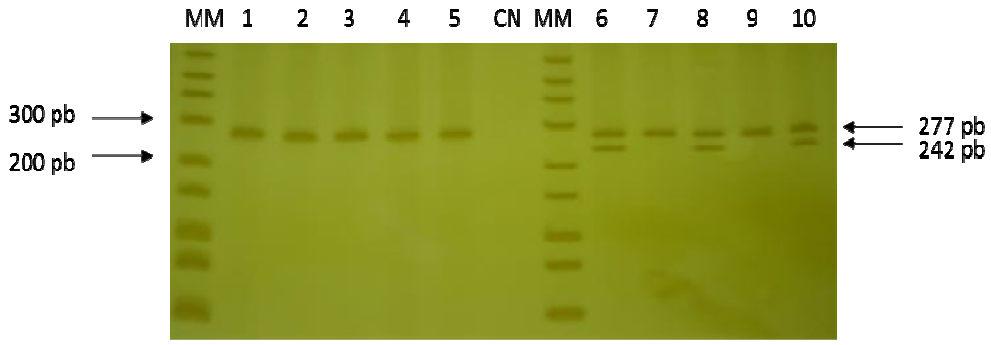


Figura 11- Produtos de PCR de parte do gene beta da globina, éxon 2 (277 pb; ver amostras de 1 a 5). Os produtos dessa PCR foram submetidos à restrição enzimática com Hpy188I para a averiguação da mutação *HBB*:c.304G>C (Hb Rush). As canaletas correspondentes às amostras de RFLP são as de número 6 a 10, as quais correspondem aos produtos de PCR 1 a 5, respectivamente nessa ordem, digeridos com Hpy188I. Das cinco amostras apresentadas, três são heterozigotas para a mutação da Hb Rush (canaletas 6, 8 e 10), pois a enzima Hpy188I clivou um dos fragmentos de 277 pb (éxon 2 do gene beta) em outros dois, de tamanhos 242 pb e 35 pb (não visível no gel). As amostras presentes nas canaletas 7 e 9 não possuem a Hb Rush, pois possuem apenas o fragmento de parte do gene beta selvagem. MM=marcador molecular; pb=pares de base; CN=controle negativo. Gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata.

Apêndice 17.4 - Resultados dos sequenciamentos de DNA

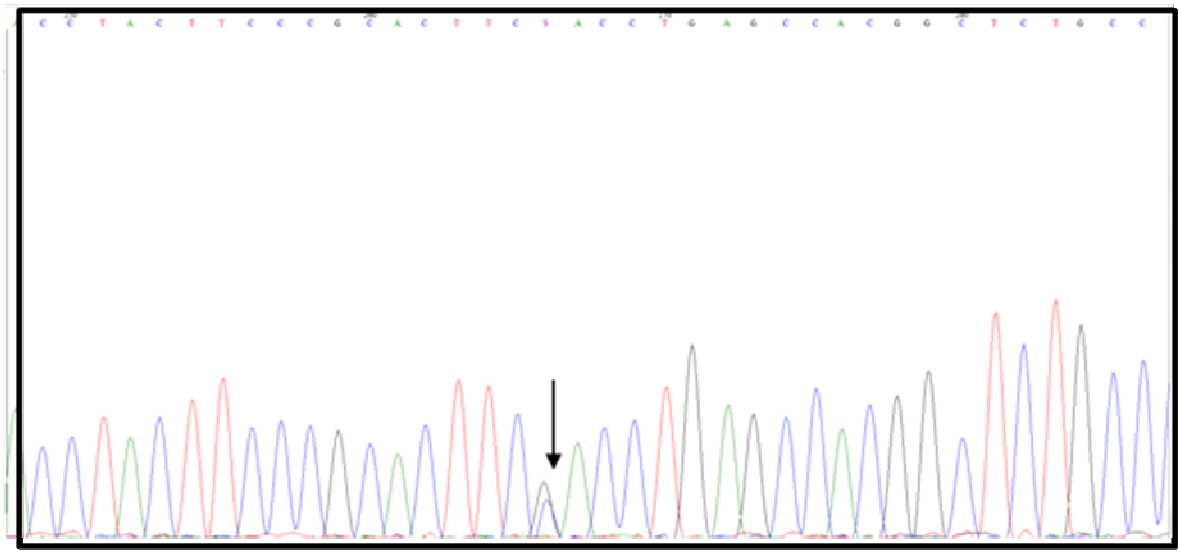


Figura 1- Eletroforegrama correspondente ao sequenciamento do éxon 2 do alelo *HBA* híbrido (com deleção alfa 3.7) de uma criança do estudo, demonstrando a mutação GAC>CAC em heterozigose no códon 47 (seta), que codifica a Hb Hasharon.

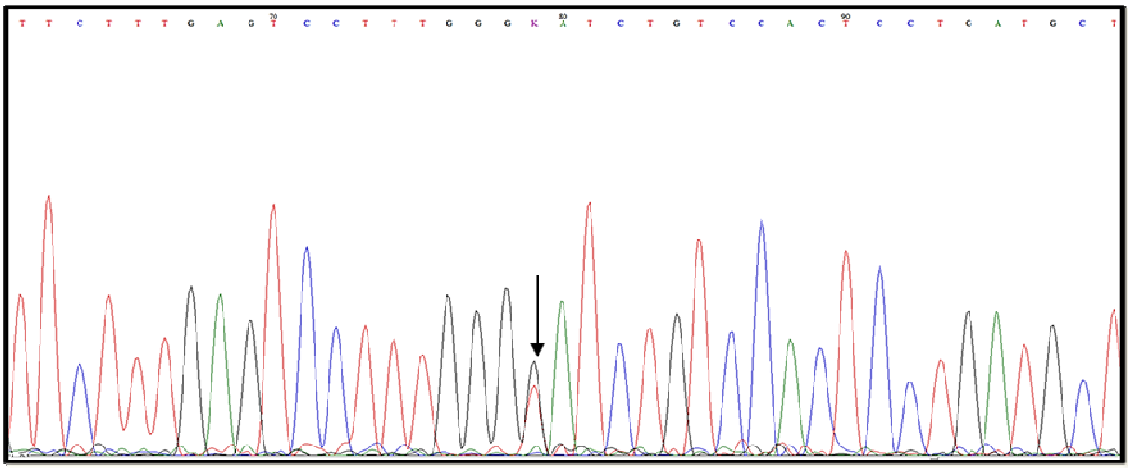


Figura 2- Eletroforegrama correspondente ao sequenciamento do éxon 2 do gene *HBB* de uma criança do estudo, evidenciando a mutação GAT>TAT em heterozigose no códon 47 (seta), o qual codifica a Hb Maputo.

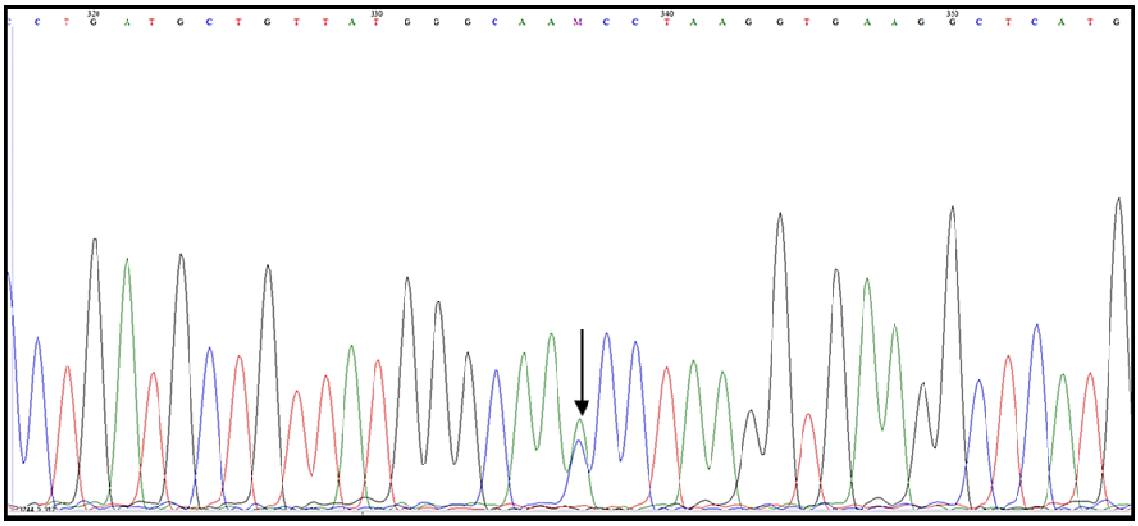


Figura 3- Eletroforegrama correspondente ao sequenciamento do éxon 2 do gene *HBB* beta da globina de uma criança do estudo, demonstrando a mutação AAC>AAA em heterozigose no códon 57 (seta), que codifica a Hb G-Ferrara.

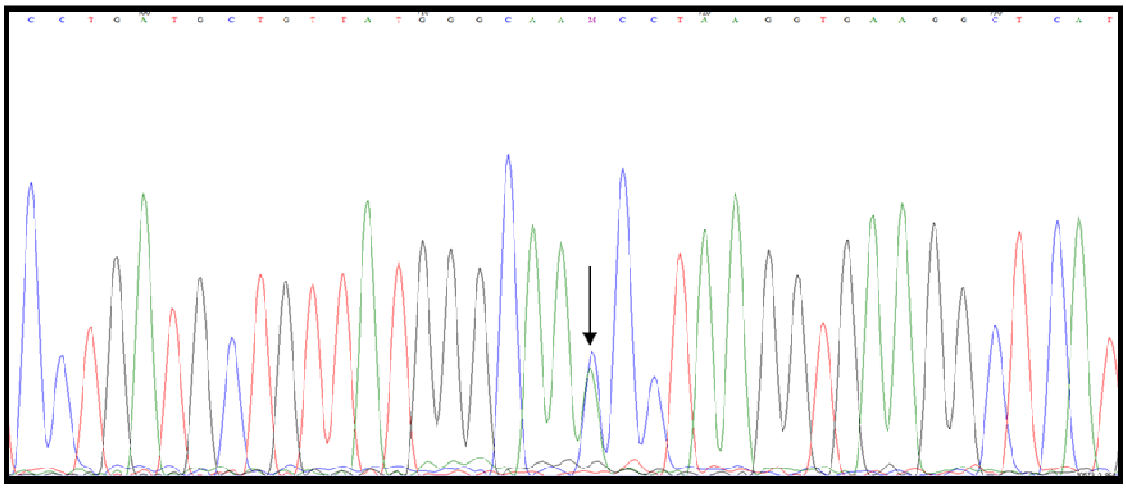


Figura 4- Eletroforegrama correspondente ao sequenciamento do éxon 2 do gene *HBB* da mãe da criança com eletroforegrama representado na Figura 3, demonstrando a mutação AAC>AAA em heterozigose no códon 57 (seta), que codifica a Hb G-Ferrara.

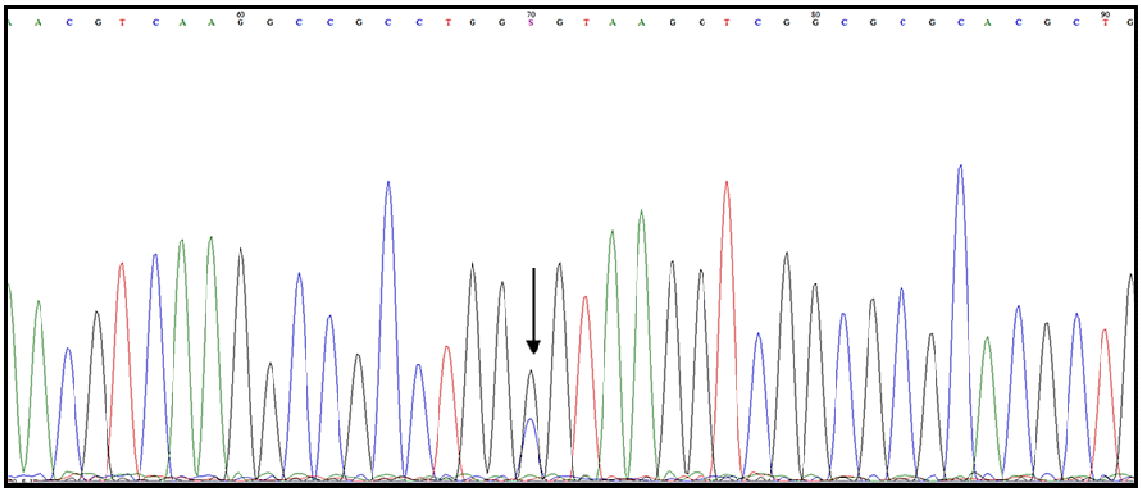


Figura 5- Eletroforegrama correspondente ao sequenciamento do éxon 1 do gene *HBA1* de uma criança do estudo, no qual se evidencia a mutação GGT>CGT em heterozigose no códon 15 (seta), que codifica a Hb Ottawa.

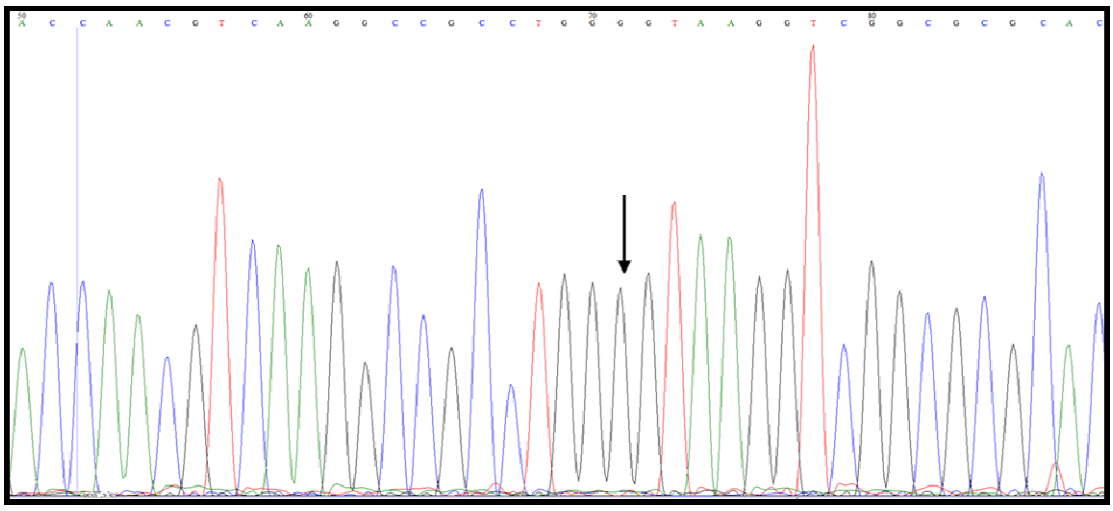


Figura 6- Eletroforegrama correspondente ao sequenciamento do éxon 1 do gene *HBA2* da criança com eletroforegrama representado na Figura 5, demonstrando a ausência da mutação GGT>CGT (Hb Ottawa) no códon 15 (seta) desse gene, comprovando que essa mutação se encontra no gene *HBA1*.

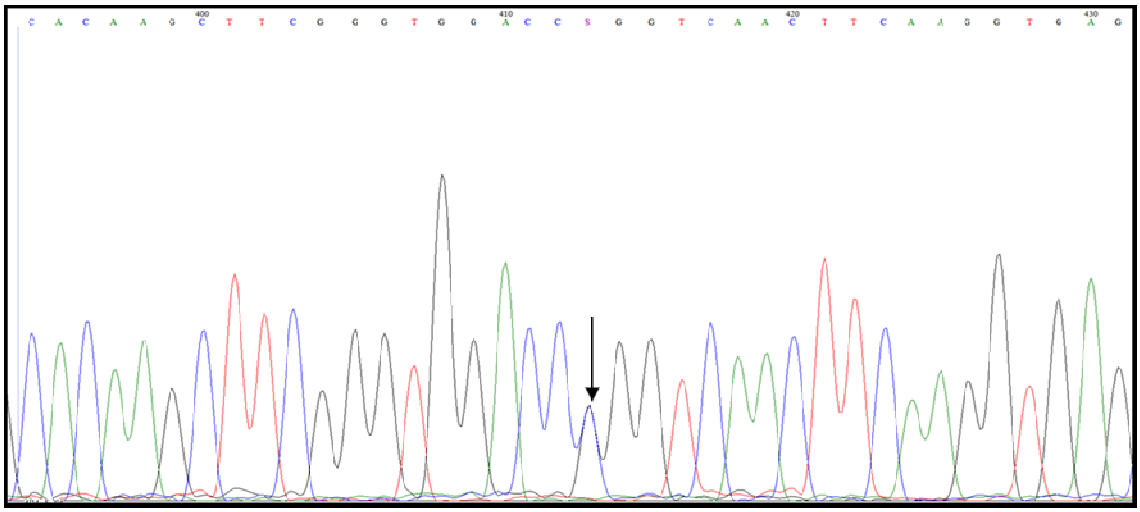


Figura 7- Eletroforegrama correspondente ao sequenciamento do éxon 2 do gene *HBA1* de uma criança do estudo, demonstrando a mutação CCG>CGG em heterozigose no códon 95 (seta), a qual resulta em Hb St. Luke's.

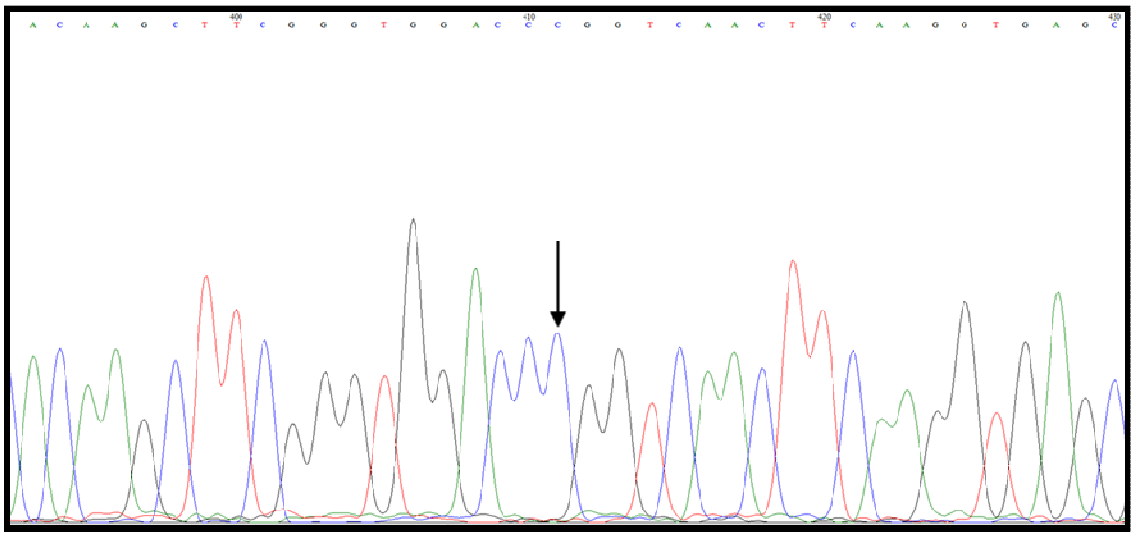


Figura 8- Eletroforegrama correspondente ao sequenciamento do éxon 2 do gene *HBA2* da criança com eletroforegrama representado na Figura 7, demonstrando a ausência da mutação CCG>CGG (Hb St. Luke's) no códon 95 (seta) desse gene, comprovando que essa mutação se encontra no gene *HBA1*.

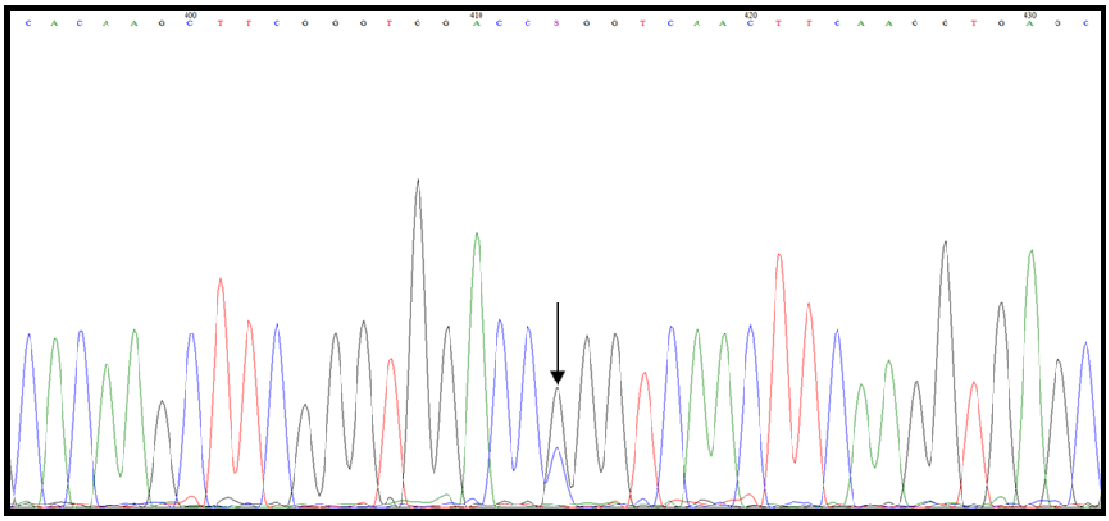


Figura 9- Eletroforegrama correspondente ao sequenciamento do éxon 2 do gene *HBA1* da mãe da criança com eletroforegrama representado na Figura 7, demonstrando a mutação C<u>C</u>G>C<u>G</u>G no códon 95 (seta), a qual resulta em Hb St. Luke's.

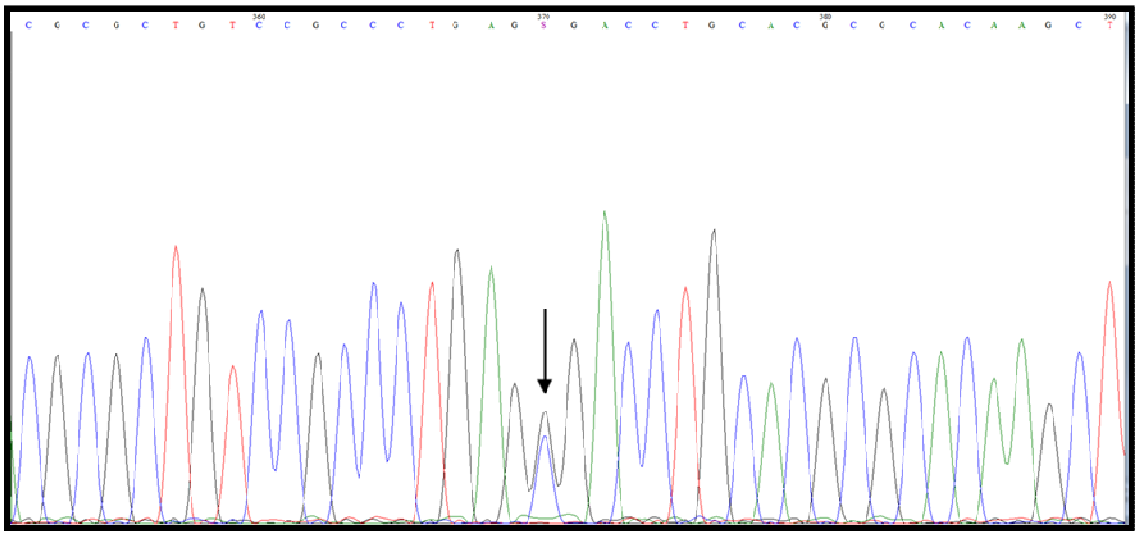


Figura 10- Eletroforegrama correspondente ao sequenciamento do éxon 2 do gene *HBA2* de uma criança do estudo, demonstrando a mutação AG<u>C</u>>AG<u>G</u> em heterozigose no códon 84 (seta), a qual resulta em Hb Etobicoke.

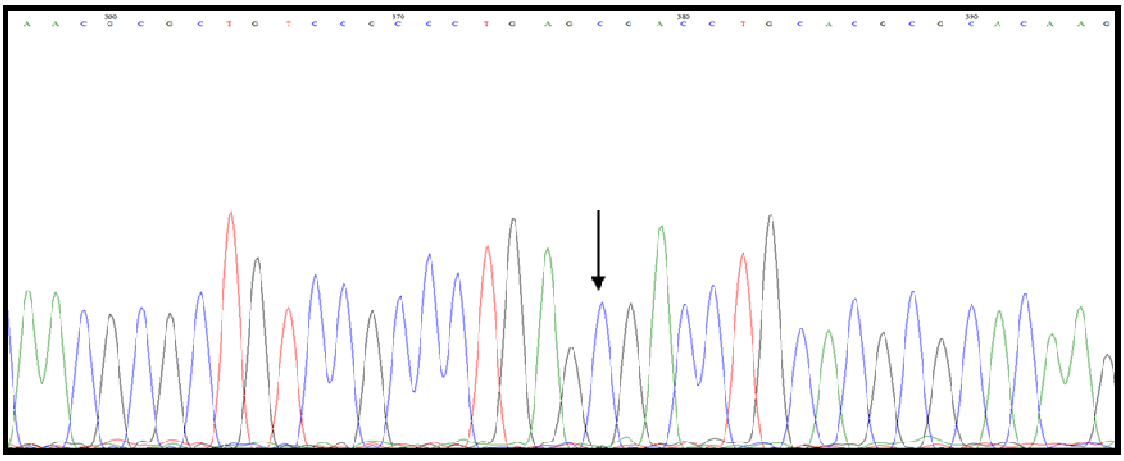


Figura 11- Eletroforegrama correspondente ao sequenciamento do éxon 2 do gene *HBA1* da criança com eletroforegrama representado na Figura 10, demonstrando ausência da mutação AGC>AGG (Hb Etobicoke) no códon 84 (seta) desse gene, comprovando que essa mutação se encontra no gene *HBA2*.

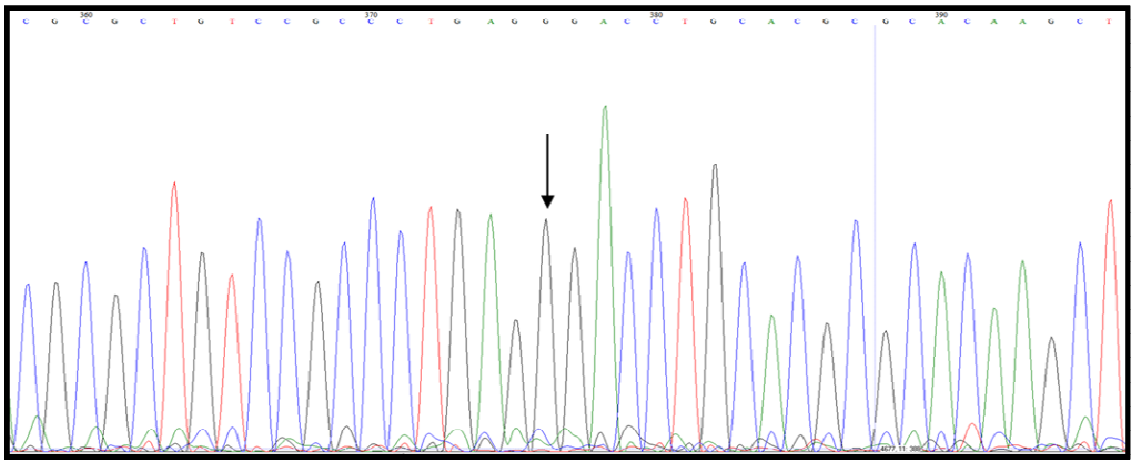


Figura 12- Eletroforegrama correspondente ao sequenciamento do éxon 2 do gene *HBA2* do pai da criança com eletroforegrama representado na Figura 10, demonstrando a mutação AGC>AGG no códon 84 (seta), a qual resulta em Hb Etobicoke. O pai da criança da Figura 10 não é homozigoto para essa mutação, uma vez que ele apresenta deleção alfa 3.7 no cromossomo homólogo.

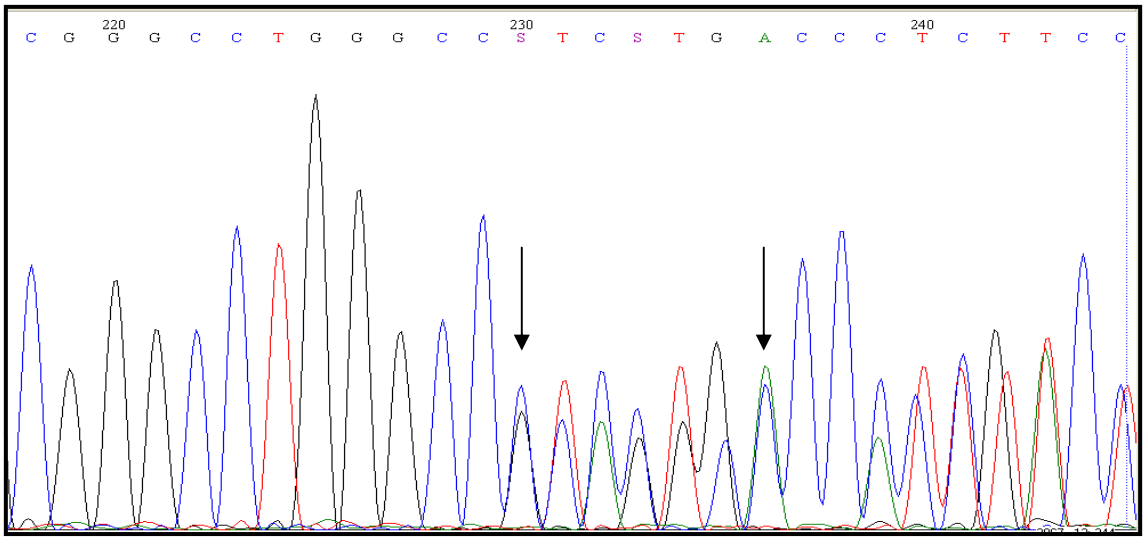


Figura 13- Eletroforegrama correspondente ao sequenciamento do íntron 2 (IVS-II) do gene *HBA2* da criança que apresenta a Hb Etobicoke. Demonstra-se a presença de 7 nucleotídeos exclusivos do gene *HBA1* (destacados pela seta), em heterozigose com a sequência que é característica dessa região de IVS-II do gene *HBA2*. O fragmento foi amplificado com iniciadores específicos para o gene *HBA2*, mostrando que a criança apresenta um alelo híbrido *HBA212* (denominado α212), cujo mecanismo de formação pode ser conversão gênica, duplo *crossover* ou *crossover* simples do cromossomo selvagem (*HBA2HBA1)*) com o cromossomo híbrido correspondente ao tipo I da forma delecional 3.7 da alfa-talassemia ($-\alpha^{3.7}$).

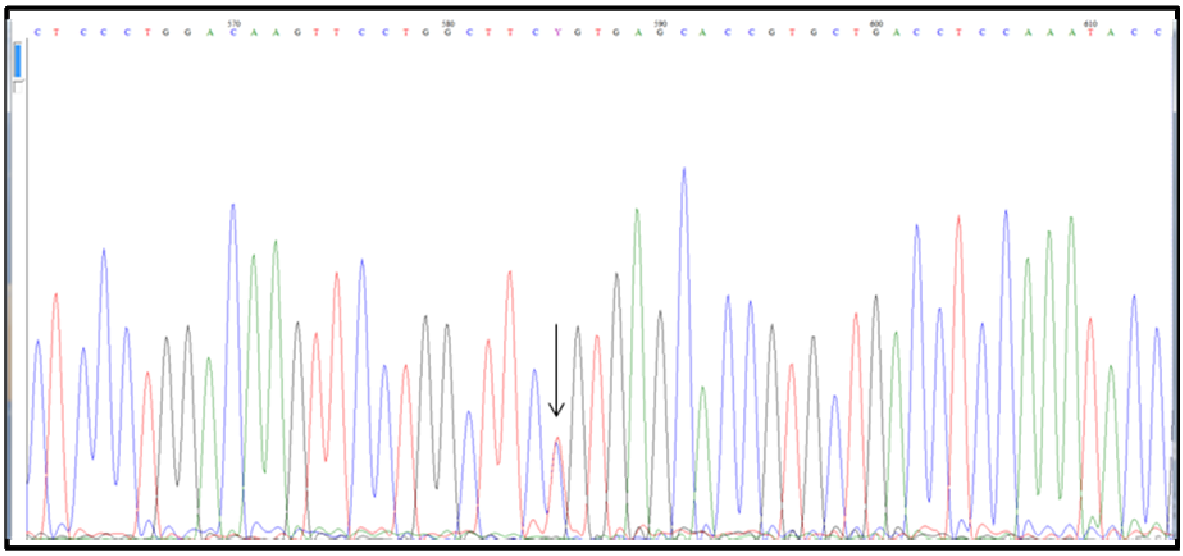


Figura 14- Eletroforegrama correspondente ao sequenciamento do códon 131 do éxon 3 de *HBA1* da criança que apresenta a Hb Etobicoke. Na seta destaca-se a mutação silenciosa (Ser>Ser; TC<u>T</u>>TC<u>C</u>; rs149264789).