



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

**ÉRICA LOUBACK DE OLIVEIRA**

**INCIDÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, HEMATOLÓGICA E  
CLÍNICA DO SUBTIPO S/BETA-TALASSEMIA EM COORTE DE CRIANÇAS  
TRIADAS PELO PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS  
E ACOMPANHADAS NA FUNDAÇÃO HEMOMINAS**

**BELO HORIZONTE**

**2019**

**Érica Louback de Oliveira**

**INCIDÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, HEMATOLÓGICA E CLÍNICA DO SUBTIPO S/BETA-TALASSEMIA EM COORTE DE CRIANÇAS TRIADAS PELO PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS E ACOMPANHADAS NA FUNDAÇÃO HEMOMINAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Área de Concentração Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Marcos Borato Viana

Coorientador: Dr. André Rolim Belisário

**BELO HORIZONTE**

**2019**

OL48i Oliveira, Érica Louback de.  
Incidência, caracterização molecular, hematológica e clínica do subtipo S/Beta-Talassemia em coorte de crianças triadas pelo programa triagem neonatal de Minas Gerais e acompanhadas na Fundação Hemominas [manuscrito]. / Érica Louback de Oliveira. -- Belo Horizonte: 2019.  
126f.: il.  
Orientador (a): Marcos Borato Viana.  
Coorientador (a): André Rolim Belisário.  
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Anemia Falciforme. 2. Hemoglobinopatias. 3. Haplótipos. 4. Triagem Neonatal. 5. Dissertação Acadêmica. I. Viana, Marcos Borato. II. Belisário, André Rolim. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WH 170



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

UFMG

## ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA ÉRICA LOUBACK DE OLIVEIRA

Realizou-se, no dia 05 de julho de 2019, às 14:30 horas, sala 526 (sala de Videoconferência do CPG), 5º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada "ESTUDO DE INCIDÊNCIA E HISTÓRIA NATURAL DA DOENÇA FALCIFORME DO SUBTIPO S/BETA-TALASSEMIA EM COORTE DE CRIANÇAS TRIADAS PELO PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS E ACOMPANHADAS NA FUNDAÇÃO HEMOMINAS.", apresentada por ÉRICA LOUBACK DE OLIVEIRA, número de registro 2017652525, graduada no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente, perante a seguinte Comissão Examinadora formada pelos Professores Doutores: Marcos Borato Viana - Orientador (UFMG), André Rolim Belisário (HEMOMINAS), Maria de Fátima Sonati – por videoconferência (UNICAMP), e Paulo do Val Rezende (UFMG).

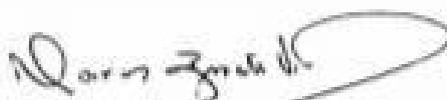
A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

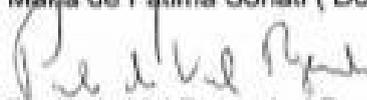
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 05 de julho de 2019.

  
Prof. Marcos Borato Viana (Doutor)

  
Dr. André Rolim Belisário (Doutor)

  
Prof.ª Maria de Fátima Sonati (Doutora)

  
Dr. Paulo do Val Rezende (Doutor)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

UFMG

## FOLHA DE APROVAÇÃO

ESTUDO DE INCIDÊNCIA E HISTÓRIA NATURAL DA DOENÇA FALCIFORME DO SUBTIPO S/BETA-TALASSEMIA EM COORTE DE CRIANÇAS TRIADAS PELO PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS E ACOMPANHADAS NA FUNDAÇÃO HEMOMINAS.

### ÉRICA LOUBACK DE OLIVEIRA

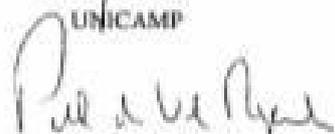
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Ciências da Saúde.

Aprovada em 05 de julho de 2019, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof. Marcos Borato Viana - Orientador  
UFMG

  
Dr. André Rolim Belisário - Coorientador  
HEMOMINAS

  
Prof.ª Maria de Fátima Sonati  
UNICAMP

  
Dr. Paulo do Val Rezende  
UFMG

Belo Horizonte, 05 de julho de 2019.

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Faculdade de Medicina**  
**Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Área de Concentração Saúde da Criança e do Adolescente**

**Reitora:** Prof.a Sandra Regina Goulart Almeida

**Vice-Reitor:** Prof. Alessandro Fernandes Moreira

**Pró-Reitor de Pós-Graduação:** Prof. Fabio Alves da Silva Junior

**Pró-Reitor de Pesquisa:** Prof. Mário Fernando Montenegro Campos

**FACULDADE DE MEDICINA:**

**Diretor da Faculdade de Medicina:** Prof. Humberto José Alves

**Vice-Diretora da Faculdade de Medicina:** Prof.a Alamanda Kfoury Pereira

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - ÁREA DE  
CONCENTRAÇÃO SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

**Coordenador do Centro de Pós-Graduação:**

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

**Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação:**

Prof.a Eli Iola Gurgel Andrade

**Chefe do Departamento de Pediatria:**

Prof.a Mônica Maria de Almeida Vasconcelos

**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da  
Criança e do Adolescente:**

Prof.a Roberta Maia de Castro Romanelli

**Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde  
da Criança e do Adolescente:**

Prof.a Débora Marques de Miranda

**Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da  
Criança e do Adolescente:**

Prof.a Ana Cristina Simões e Silva – Titular

Prof. Eduardo Araújo de Oliveira – Suplente

Prof. Jorge Andrade Pinto – Titular

Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira – Suplente

Prof.a Helena Maria Gonçalves Becker – Titular

Prof.a Ana Cristina Côrtes Gama – Suplente

Prof.a Roberta Maia de Castro Romanelli – Titular

Luana Caroline dos Santos – Suplente Prof.a

Juliana Gurgel – Titular

Prof.a Ivani Novato Silva – Suplente

Prof.a Débora Marques de Miranda – Titular Prof.

Leandro Fernandes Malloy Diniz – Suplente Prof.

Sérgio Veloso Brant Pinheiro – Titular

Prof. Cássio da Cunha Ibiapina – Suplente

Prof.a Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana – Titular

Prof.a Lêni Márcia Anchieta – Suplente

Ariene Silva do Carmo – Discente Titular

Elisângela Pessoa de Aguiar – Discente Suplente

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que esteve comigo durante toda a jornada, que me deu forças para continuar.

Aos participantes da pesquisa, crianças, pais, mães e responsáveis, pela colaboração, confiança e pela luta a favor dos pacientes com doença falciforme.

Ao meu orientador professor Marcos Borato Viana, por ser um grande exemplo de profissional, de ética, entusiasmo pela pesquisa. Muito grata por ter recebido uma excelente orientação do primeiro hematologista pediátrico do Brasil.

Ao meu coorientador André Rolim Belisário, pela oportunidade, exemplo, profissionalismo e ética.

À minha orientadora de iniciação científica Dra Maria Clara da Silva Malta, pela primeira oportunidade na área da pesquisa.

Aos meus pais Antonio Alves de Oliveira e Maria Alves Louback de Oliveira, pelo incentivo desde o início da graduação.

Aos meus irmãos Elaine Louback de Oliveira e Ederson Louback de Oliveira e meus sobrinhos Matheus, Isabella e Maria Clara por todo apoio.

Ao meu esposo Diego A. M. Ferreira por toda paciência, amor, compreensão e incentivo para não desistir.

Ao Serviço de Pesquisa da Fundação Hemominas, onde fiz grandes amigos.

Aos médicos, Dra. Célia e Dr. Paulo por toda ajuda e, em especial, na coleta de termos de consentimento.

Ao laboratório de hemoglobinopatias do departamento de patologia clínica da Universidade Estadual de Campinas- Unicamp, pela realização dos experimentos de MLPA, importantes para o estudo.

Às instituições envolvidas FUNDAÇÃO HEMOMINAS, UFMG, NUPAD, FAPEMIG e CNPQ pela estrutura e pelo financiamento que possibilitaram a realização da pesquisa.

*" Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e,  
ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a  
humanidade. "*

Marie Curie

## RESUMO

A S $\beta$ -talassemia (S $\beta$ -tal) é uma hemoglobinopatia heterozigótica, caracterizada pela presença de um alelo  $\beta^S$  associado com alelo beta-talassêmico. O nível residual de produção da HbA é o principal fator preditivo. Moduladores genéticos podem influenciar na heterogeneidade, como os haplótipos e a co-herança da talassemia alfa. O objetivo do estudo foi estimar a incidência e descrever características moleculares, hematológicas e clínicas em coorte de recém-nascidos (RN) com S $\beta$ -tal e triadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais e acompanhadas na Fundação Hemominas. As mutações foram identificadas por sequenciamento. A genotipagem dos haplótipos  $\beta^S$  e  $\beta$ -tal foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR), Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP) ou sequenciamento. A identificação das deleções e da triplicação de genes da globina alfa foi realizada por gap-PCR multiplex. A identificação da deleção de Corfu em pacientes com IVS-I-5 G>A foi realizada por meio de Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação (MLPA). A concentração relativa das frações de hemoglobina foi feita na grande maioria dos casos, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A incidência de S $\beta$ -tal em 5 anos (2011-2015) foi de 1:22.250 (53 casos em 1.179.389 RN; IC 95% 1:17.530-1:30.450); 29 RN com S $\beta$  0 -tal (54,7%) e 24 com S $\beta$  +-tal (45,3%). Para descrição das características da S $\beta$ -tal foram analisadas 89 crianças (83 famílias) com média de idade de 10,9 anos. Foram identificados 14 mutações: 22 (24,7%) com CD39 C>T; 16 (18,0%) com IVS-I-1 G>A; 10 (11,2%) com IVS-I-6 T>C; 9 (10,1%) com -29 A>G; 8 (9,0%) com IVS-I-110 G>A; 6 (6,7%) com IVS-I-5 G>A; 4 (4,5%) com IVS-II-1 G>A; 3 (3,4%) com IVS-II-839 T>C e IVS-II-844 C>A, em cis; 2 (2,2%) com -88 C>T; 2 (2,2%) com -92 C>T; 2 com (2, 2%) IVS-II-849 A>G; e um (1,2%), cada, com -101 C>T, IVS-I-2 T>C e poliadelinação AATAAA>AACAAA. Em duas crianças, a mutação  $\beta$ -tal não foi identificada. Nas crianças com a mutação IVS-I-5 G>A, não se detectou a deleção Corfu. Os haplótipos  $\beta^S$  mais frequentes foram CAR e Benin. Em relação aos haplótipos  $\beta$ -talassêmicos, os mais frequentes foram I, II e IV. Quanto à co-herança de alfa talassemia, 68 (79%) tinham genótipo selvagem ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ), 16 (18,6 %) eram  $\alpha/\alpha 3.7$ ; uma era  $-\alpha 3.7 / -\alpha 3.7$  e uma tinha triplicação do gene alfa ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha 3.7$ ). A incidência de eventos clínicos por 100 pacientes-ano foi semelhante nos genótipos S $\beta$ 0-tal e nas mutações IVS-I-110 G>A e IVS-I-5 G>A. Nesta última, a concentração de HbA por HPLC foi nula em todas as seis crianças e grave o quadro clínico. Notou-se, ainda, que o quadro clínico e laboratorial dos outros genótipos S $\beta$  +-tal (Hb A acima de 10%) são distintos entre si e que é falacioso agregar, como em alguns relatos na literatura, todas essas mutações num único grupo. Concluímos que

a incidência relativa da S $\beta$ -tal em Minas Gerais representa cerca de 6% do total de casos com doença falciforme. A identificação correta da da mutação auxilia no prognóstico da doença e na adoção de medidas preventivas, visando à sobrevida com mais qualidade desse grupo de pacientes.

Palavras-chave: Hemoglobinopatia. S $\beta$ -talassemia. Haplótipos. Triagem Neonatal.

## ABSTRACT

The  $S\beta$ -thalassemia ( $S\beta$ -tal) is a hemoglobinopathy heterozygous, characterized by the presence of a  $\beta^S$  allele associated with the beta-thalassemia allele. The residual HbA production level is the main predictor. Genetic modulators may influence the heterogeneity, such as haplotypes and co-inheritance of alpha thalassemia. The aim of the study was to estimate the incidence and describe molecular, hematological and clinical characteristics in a cohort of newborns with  $S\beta$ -tal in Minas Gerais and screened as part of the Neonatal Screening Program in the Brazilian state of Minas Gerais and treated at Hemominas Foundation. Mutations were identified by sequencing. Genotyping of  $\beta^S$  and  $\beta$ -thal haplotype polymorphisms were performed by polymerase chain reaction (PCR), and restriction fragment length polymorphism (RFLP) or sequencing. The identification of deletions and triplication of alpha globin genes were performed by multiplex gap-PCR. Identification of the Corfu deletion in patients with IVS-I-5 G>A was performed using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). The relative concentration of hemoglobin fractions was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) in the vast majority of cases. The incidence of 5-year  $S\beta$ -tal (2011-2015) was 1:22,250 (53 cases in 1,179,389 NB; 95% CI 1: 17,530-1: 30,450); 29 newborns with  $S\beta^0$ -tal (54.7%) and 24 with  $S\beta^+$ -tal (45.3%). To describe the characteristics of  $S\beta$ -tal 89 children (83 families) with a mean age of 10.9 years. Were 14 mutations were identified. 89 children were included in the study with a mean age of 10.9 years and 14 mutations were identified; 22 (24,7%) with CD39 C> T; 16 (18,0%) IVS-I-1 G> A; 10 (11, 2%) IVS-I-6 T> C; 9 (10, 1%) -29 A> G; 8 (9,0%) IVS-I-110 G> A; 6 (6, 7%) IVS-I-5 G> A; 4 (4,5%) IVS-II-1 G> A; 3 (3,4%) IVS-II-844 C> A e IVS-II-839 T> C; 2 (2,2%) -88 C> T; 2 (2,2%) -92 C> T; 2 (2,2%) IVS-II-849 A> G; and one (1,2%) each for -101 C> T; IVS-I-2 T> C, and poly A signal (AATAAA> AACAAA). In two cases of  $S\beta^+$ -Thal, no mutation was found. In the children with the mutation IVS-I-5 G> A, the Corfu deletion was not detected. The incidence of  $S\beta$ -Thal in the state of Minas Gerais was 1:22,250 (53 cases in 1,179,389 newborns for 5 years, 2011-2015). The incidence for the  $S\beta^0$ -Thal subtype was 1:40,670 and that for  $S\beta^+$ -Thal, 1:49,140. The most common  $\beta^S$  haplotypes were CAR and Benin, in this order. In relation to  $\beta$ -thalassemic haplotypes, the most prevalent were I, II and IV. As far as the co-inheritance of alpha thalassemia, 68 (79%) had wild genotype ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ), 16 (18.6%) were  $\alpha^-/\alpha^3.7$ ; one was  $-\alpha^3.7/-\alpha^3.7$ , and one had triplication of the alpha gene ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha-3.7$ ). In general, the incidence of clinical events per

100 patient-years was similar for the S $\beta$ 0- Thal genotypes and for the IVS-I-110 G> A and IVS-I-5 G> A mutations. In the latter, the concentration of HbA by HPLC was null in all six children, being clinically severe. Clinical and laboratory status of the other S $\beta$ + Thal genotypes (Hb A above 10%) is so different that it is misleading to aggregate, as in some reports in the literature, all these mutations in a single group. We conclude that the relative incidence of S $\beta$ -Thal in Minas Gerais represents approximately 6% of the total cases with sickle cell disease. The correct identification of the mutation helps in the prognosis of the disease and in the adoption of preventive measures, aiming at a better quality of survival for this group of patients.

Key words: Hemoglobinopathy. S $\beta$ -thalassemia. Haplotypes. Neonatal Screening.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Representação esquemática da mudança no padrão de expressão dos genes do agrupamento da  $\beta$ -globina no cromossomo 11 e  $\alpha$ -globina no cromossomo 16 ..... 25
- Figura 2- Representação esquemática do padrão de síntese e expressão de cada gene da globina durante o desenvolvimento humano ..... 26
- Figura 3 - Representação esquemática do processo de polimerização da HbS em baixa concentração de oxigênio ..... 28
- Figura 4 - Representação esquemática entre fenômenos fisiopatológicos e manifestações clínicas nas doenças falciformes ..... 30
- Figura 5 - Ilustração das regiões 5'UTR e 3'UTR gene da beta globina, mostrando as regiões sequenciadas para identificação das mutações da talassemia beta heterozigótica associada à Hb S. A linha horizontal representa as categorias das mutações e as linhas verticais representam os locais das mutações. Adaptado de THEIN, 2013 (71)..... 40
- Figura 6 -Representação dos cinco principais padrões de haplótipos  $\beta^S$  com polimorfismos e fragmento de restrição ..... 47
- Figura 7- Representação das regiões geográficas de acordo com a predominância dos haplótipos  $\beta^S$ ..... 48
- Figura 8-Representação dos haplótipos  $\beta$ -Tal com os diversos sítios polimórficos detectados por enzimas de restrição, bem como sua frequência relativa. .... 50
- Figura 9 - Fluxograma de seleção amostral com base nos critérios de inclusão e exclusão ..... 55
- Figura 10 : Representação esquemática do gene da *HBB* e as regiões do fragmento 1 e 2 utilizadas no sequenciamento. .... 58

Figura 11- Representação esquemática do <i>cluster</i> da $\alpha$ globina e a localização dos <i>primers</i> . a) representação do processo de fusão do gene e a triplicação $\alpha\alpha\alpha$ -3.7. b) Representação das sete principais deleções.....	66
Figura 12– Eletroferograma referente ao sequenciamento do gene <i>HBB</i> , mostrando a mutação CD 39 C>T.....	72
Figura 13 – Genotipagem do fragmento $A\gamma$ .....	73
Figura 14 – Genotipagem do fragmento $G\gamma$ .....	73
Figura 15 – Genotipagem do fragmento $\psi\beta$ .....	74
Figura 16– Genotipagem do fragmento $3'\psi\beta$ .....	74
Figura 17 – Genotipagem do fragmento $5'\beta$ .....	75
Figura 18 – Eletroferograma referente ao sequenciamento do gene <i>HBE</i> com o polimorfismo rs3834466 .....	75
Figura 19 – Eletroferograma referente ao sequenciamento do sítio $\beta$ (IVS-II-16 G>C), com o polimorfismo rs10768683. ....	76
Figura 20 – Genotipagem de $3'$ de <i>HBB</i> . Gel de agarose 3% corado com brometo de etídio contendo produtos de <i>RFLP</i> a $3'$ de <i>HBB</i> (polimorfismo rs10837631) .....	76
Figura 21- Fotografia do gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, contendo produtos de PCR múltipla para diagnóstico molecular de 2 deleções e triplicação no gene <i>HBA</i> . ....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características laboratoriais da S $\beta$ -Tal .....	33
Tabela 2- Síntese dos principais estudos sobre S $\beta$ -Tal.....	35
Tabela 3 - Tipos de mutações e mecanismos que influenciam a produção da hemoglobina .....	41
Tabela 4 - Distribuição de mutações dos alelos beta talassêmicos em algumas regiões do Brasil.....	43
Tabela 5- Iniciadores ( <i>primers</i> ) utilizados na amplificação do fragmento 1 e fragmento 2 do gene <i>HBB</i> .....	59
Tabela 6 - Condições para determinação dos haplótipos $\beta^S$ / $\beta$ -Tal. ....	62
Tabela 7 - Sequência de oligonucléotídeos sintéticos para as deleções e triplicação da $\alpha$ -Tal.....	66
Tabela 8- Estratificação Doppler transcraniano .....	68
Tabela 9 - Descrição dos haplótipos $\beta^S$ e $\beta$ -tal em 86 crianças, de acordo com o tipo de mutação.....	77
Tabela 10 - Valores médios ( $\pm$ erro padrão da média) dos exames hematológicos de acordo com o tipo de mutação .....	81
Tabela 11 - Comparação de valores hematimétricos entre quatro genótipos de mutação de S $\beta$ -talassemia.....	83
Tabela 12 – Comparação de valores hematimétricos entre três genótipos de mutação de S $\beta$ -talassemia.....	84
Tabela 13– Comparação de valores hematimétricos ( $\pm$ erro padrão da média) entre dois genótipos de S $\beta^+$ -talassemia moderada e três genótipos de S $\beta^+$ -talassemia leve .....	85
Tabela 14- Comparação hematológica entre as mutações CD 39 C>T e IVS-I-1 G>A em relação a co-herança de alfa talassemia. ....	86

Tabela 15 - Incidência de eventos clínicos por 100 pacientes-ano.....	89
Tabela 16- Incidência de eventos clínicos em alguns dos genótipos mais frequentes da casuística.....	89
Tabela 17- Comparação da incidência de eventos clínicos entre três genótipos de mutação de S $\beta$ -talassemia .....	90
Tabela 18 - Comparação da incidência de eventos clínicos entre dois genótipos de S $\beta$ <sup>+</sup> -talassemia moderada e três genótipos de S $\beta$ <sup>+</sup> -talassemia leve .....	91
Tabela 19- Eventos clínicos por 100 pacientes-ano em relação à co-herança de alfa talassemia. ....	92

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Caracterização amostral por sexo.....	70
Gráfico 2 – Frequência absoluta e relativa das mutações encontradas.....	72
Gráfico 3 - Resultado do produto da reação de <i>MLPA</i> para identificação da deleção Corfu. .....	78
Gráfico 4 - Distribuição das mutações do alelo beta-talassêmico, de acordo com a quantidade de genes da alfa globina .....	80
Gráfico 5 – Distribuição dos valores da concentração de HbA de acordo com o tipo de mutação.....	82
Gráfico 6 Distribuição dos grupos de S $\beta$ -tal de acordo com o tipo de mutação .....	83
Gráfico 7 - Curva de probabilidade de ocorrência do primeiro episódio de SEA; método de Kaplan-Meier, função (1-Sobrevida).....	93
Gráfico 8 - Curva de probabilidade de ocorrência do primeiro episódio de SEA entre as mutações CD39 C>T e IVS-I-1 G>A; método de Kaplan-Meier, função (1-Sobrevida). .....	93
Gráfico 9 - Curva de probabilidade de ocorrência do primeiro episódio de SEA entre os haplótipos $\beta^S$ CAR e Benin nas 22 crianças com a mutação CD39 C>T; método de Kaplan-Meier, função (1-Sobrevida).....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AVC**-Acidente Vascular Cerebral  
**AIT** – Acidente isquêmico transitório  
**Ben** – Benin  
**Cam** – Camarões  
**CAR** - Central African Republica  
**CEP** - Comitê de Ética em Pesquisa  
**COEP** - Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG  
**CVO**- Crises vaso-oclusivas dolorosas  
**dL** – Decilitro  
**DNA** - Ácido desoxirribonucleico  
**dNTP** - deoxynucleotide triphosphate - desorribonucleotídeo trifosfatado  
**DP** – Desvio padrão  
**DTC** – Doppler transcraniano cerebral  
**fL** - fentolitro  
**FS** - Padrão eletroforético com hemoglobinas fetal e S  
**FSA** - Padrão eletroforético com hemoglobinas fetal, S e A  
**g/dL** – gramas por decilitro  
**Glu** - Ácido Glutâmico  
**Haplótipos  $\beta^S$**  - Haplótipos do agrupamento de genes da  $\beta^S$ -globina  
**Hb** - Hemoglobina  
**Hb A** – Hemoglobina A  
**Hb A2** - Hemoglobina A2  
**Hb C** - Hemoglobina C  
**Hb D** - Hemoglobina D  
**Hb F** - Hemoglobina Fetal  
**Hb S** - Hemoglobina S  
**Hb SS** – Genótipo homocigoto para hemoglobina S  
**HBA** – Gene da globina alfa  
**HBB** – Gene da globina beta  
**HBE** - Gene épsilon  
**HBD** - Gene delta  
**HBH** - Hemocentro de Belo Horizonte  
**HCM** - Hemoglobina Corpuscular Média  
**HPLC** – High performance liquid chromatography – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
**HU** – Hidroxiureia  
**IEF** - *Isoelectric focusing* - Eletroforese por focalização isoelétrica  
**LCR** - Locus Control Region  
**L** -Litros  
**LEU** – Leucócitos  
**mg** – Miligrama  
**MgCl<sub>2</sub>** - Cloreto de magnésio  
**MLPA**- *Multi-ligation probe amplification* - Amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação  
**ng** – nanogramas  
**NO** - Nitric Oxide – Óxido Nítrico  
**NUPAD** - Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG

**PCR** - Polymerase Reaction Chain – Reação em Cadeia da Polimerase  
**PETN** - Programa Estadual de Triagem Neonatal  
**pH** - Potencial Hidrogeniônico  
**PLAQ** - Plaquetas  
**Retic** – Reticulócitos  
**RFLP** - Restriction Fragment Length Polymorphism  
**RNA** - Ácido ribonucleico  
**SEA**- Sequestro esplênico agudo  
**Sen** – Senegal  
**SNP** - Single Nucleotide Polymorphism  
**SPSS** -*Statistical Package for the Social Sciences*  
**STA**- Síndrome torácica aguda  
**STOP** – Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia  
**SUS** - Sistema Único de Saúde  
**Sβ<sup>+</sup> talassemia** - Genótipo duplo heterozigoto para hemoglobina S e β<sup>+</sup> talassemia  
**Sβ<sup>0</sup> talassemia** - Genótipo duplo heterozigoto para hemoglobina S e β Talassemia  
**TA** – Termo de Assentimento  
**TAE** – *Tris-acetate-EDTA*  
**TCLE** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
**UFMG** - Universidade Federal de Minas Gerais  
**Val** – Valina  
**VCM** - Volume Corpuscular Médio  
**VMM** - Velocidade Média Máxima  
**vs-** Versus  
**α** – alfa  
**α-Tal** – Alfa Talassemia  
**β**- beta  
**β-tal** - Beta Talassemia  
**δ**- delta  
**μL** – microlitros  
**°C** – Graus Celsius

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	23
2.1 Estrutura e função da hemoglobina .....	25
2.2 Hemoglobinopatias .....	27
2.3 Doença Falciforme.....	27
2.4 Fisiopatologia e manifestações clínicas da doença falciforme .....	29
2.5 S/beta-talassemia .....	31
2.6 Mutações do alelo $\beta$ -Talassemico.....	39
2.7 Origem e distribuição geográfica dos haplótipos $\beta^S$ e $\beta$ -Tal .....	46
2.8 Interação com Alfa Talassemia .....	50
3 OBJETIVOS .....	52
3.1 Objetivos específicos .....	52
4 MÉTODOS .....	53
4.1 Delineamento e local de estudo .....	53
4.2 Aspectos éticos.....	56
4.3 Variáveis hematológicas .....	56
4.4 Variáveis genéticas .....	57

4.5 Variáveis clínicas.....	67
5 RESULTADOS .....	70
5.1 Caracterização da amostragem para seguimento clínico e laboratorial .....	70
5.2 Incidência geral no Estado de Minas Gerais.....	70
5.3 Análises moleculares .....	71
5.4 Caracterização dos parâmetros hematológicos .....	80
1.5 Caracterização clínica.....	87
6DISCUSSÃO.....	95
7 CONCLUSÃO.....	105
8 REFERÊNCIAS .....	107
9 ANEXOS.....	123
9.1 Anexo 1: Comprovante de Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa daFundação Hemominas .....	123
9.2 Anexo 2 :Termo de consentimento livre e esclarecido.....	124

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As hemoglobinopatias são um grupo heterogêneo de doenças que afetam os genes da hemoglobina e apresentam morbidade e mortalidade relevante em todo o mundo (1,2). Consideradas como doenças multissistêmicas, afetam vários órgãos e tem grande variação nas manifestações clínicas (3,4). São doenças autossômicas e são subdivididas em dois grupos, as hemoglobinopatias estruturais, por troca de aminoácidos, e as talassemias, por deficiência da síntese de cadeias que compõem a hemoglobina (4).

As doenças falciformes são caracterizadas pela presença do alelo  $\beta^S$  em homozigose (anemia falciforme) ou do alelo  $\beta^S$  em heterozigose composta com outra mutação do gene *HBB* que resulte em subtipo clínico no qual a HbS tenha concentração superior a 50%. Essa maior concentração de HbS propicia a falcização das hemácias (1,5,6). Embora determinada primariamente por uma única mutação, as doenças falciformes apresentam ampla variação fenotípica, atribuída a moduladores genéticos e fatores ambientais que influenciam na diversidade clínica (7,8).

A doença falciforme no Brasil é considerada problema de saúde pública. Nesse contexto, em 2001, por meio da portaria nº 822/01, a detecção das hemoglobinopatias foi incluída no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) (9). No estado de Minas Gerais, a taxa de incidência da doença falciforme é estimada em 1:1.400 nascidos vivos, segundo dados do Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PTN-MG). O PTN-MG abrange todos os municípios mineiros com estimativa de cobertura de 94% dos recém nascidos (10). Os demais são testados em laboratórios privados.

O alelo HbS foi introduzido no Brasil pelo comércio de escravos no período colonial. Ao longo de 300 anos, escravos de diferentes regiões da África foram trazidos para o Brasil. Além disso, movimentos imigratórios de algumas regiões da Europa e da Ásia, em proporção muito inferior, introduziram mutações de beta talassemia no país (11–13). Configura-se, portanto, uma heterogeneidade de genótipos de doença falciforme encontrados no Brasil. O genótipo mais prevalente em nosso meio é o da anemia falciforme (Hb SS), seguida de outras variantes em estado de heterozigose composta, tais como Hb SC, Hb S $\beta$ - talassemia (Hb S $\beta$ -tal) e HbSD<sup>Punjab</sup>(14,15).

Estudos anteriores demonstraram que cada região geográfica do país apresenta características próprias quanto à frequência das diferentes mutações para os alelos  $\beta$ -talassêmicos no *locus* da  $\beta$ -globina (16–20). Essa variação reflete a composição das populações ancestrais e a intensidade de miscigenação (16,17,21,22). A frequência e a distribuição das mutações causadoras de  $\beta$ -Tal em Minas Gerais são desconhecidas.

A interação do alelo  $\beta^s$  com as mutações  $\beta$ -Tal e a importância destes distúrbios é pouco compreendida e existem poucos dados clínicos sobre a S $\beta$ -Tal a nível nacional e internacional. Da mesma forma, não existem dados sobre as consequências clínicas e laboratoriais da associação dos diversos genótipos da S $\beta$ -Tal com a co-herança de alfa talassemia e com os haplótipos da beta globina em indivíduos com Hb S $\beta$ -tal em Minas Gerais no Brasil, e há poucos estudos realizados no mundo. Além disso, não há determinações precisas da incidência da S $\beta$ -Tal no Brasil (12).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Estrutura e função da hemoglobina

A molécula da hemoglobina é a principal proteína intracelular dos eritrócitos e apresenta estrutura quaternária constituída por quatro subunidades. As subunidades são cadeias polipeptídicas compostas, no caso da Hb A, por duas cadeias alfas ( $\alpha$ ) e duas cadeias betas ( $\beta$ ), com 141 e 146 aminoácidos respectivamente ( $\alpha_2\beta_2$ ). Cada uma das quatro cadeias se liga a um grupo heme que é responsável pelo transporte de oxigênio para os tecidos (15,23,24).

A síntese das cadeias da hemoglobina humana é regulada por um padrão de genes que estão localizados em cromossomos diferentes (25,26). O *cluster* do gene da globina alfa encontra-se no braço curto do cromossomo 16 (16p13.3) e localizam-se nessa região os genes ou pseudogenes  $\zeta$ ,  $\mu\alpha$ ,  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ . O *cluster* do gene da globina beta situa-se no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5) onde estão localizados os genes ou seus pseudogenes  $\epsilon$ ,  $G\gamma$ ,  $A\gamma$ ,  $\psi\beta$ ,  $\delta$  e  $\beta$  (24,27,28).

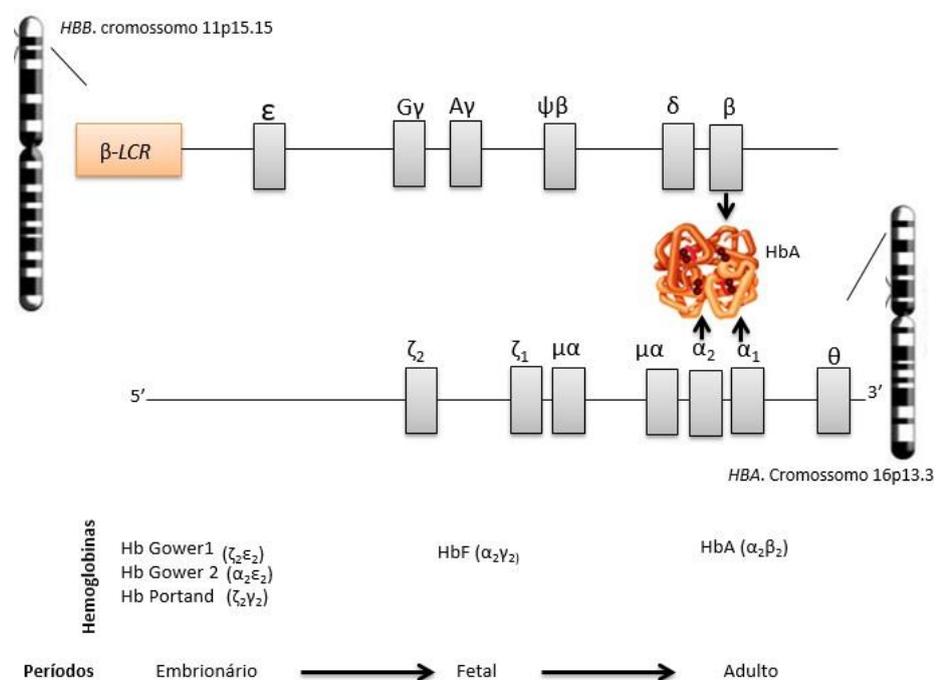


Figura 1- Representação esquemática da mudança no padrão de expressão dos genes do agrupamento da  $\beta$ -globina no cromossomo 11 e  $\alpha$ -globina no cromossomo 16. Os genes são arranjados em ordem linear e a sequência de ativação é a mesma ordem de arranjo nos cromossomos. Modificado de SCHECHTER, 2008 (24).

O padrão de transcrição dos genes da hemoglobina é alterado nos eritrócitos durante o desenvolvimento embrionário, fetal, neonatal e adulto (24). Na fase embrionária, predominam as hemoglobinas Gower1 ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ), Gower 2 ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ) e Portland (1 e 2) ( $\zeta_2\gamma_2$ ). Nos últimos dois trimestres de gestação, predomina a Hb fetal HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) (24,27,29). Após o sexto mês de nascimento, os níveis de HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) atingem níveis relativamente estáveis em indivíduos saudáveis (Figura 2).

Nos indivíduos saudáveis, a HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) representa aproximadamente 97%, a HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ), 2-3% e a Hb fetal ( $\alpha_2\gamma_2$ ), 0-2% (24,30) (Figura 2). O equilíbrio entre as sínteses de globinas alfa com as globinas beta proporciona a estabilidade da hemoglobina sendo primordial para o funcionamento de processos fisiológicos e metabólicos que ocorrem no interior das hemácias. Quaisquer disfunções nos mecanismos genéticos da molécula da Hb que resultem em diminuição ou ausência da síntese e na estrutura da hemácia ocasionam espectros fenotípicos de talassemias ou de doenças falciforme.

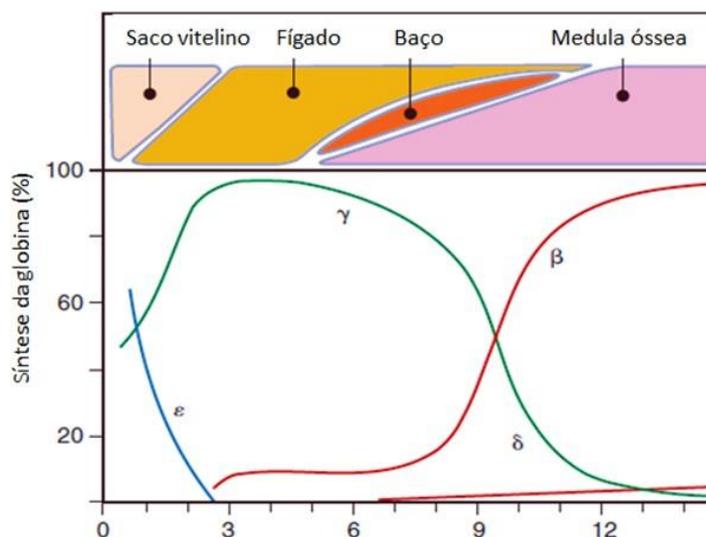


Figura 2- Representação esquemática do padrão de síntese e expressão de cada gene da globina durante o desenvolvimento humano; modificado de SANKARAN, 2013 (2).

## Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias são um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas por mutações dos genes da globina. Esses distúrbios afetam o ritmo de síntese da taxa de expressão gênica ou a estrutura dos polipeptídios responsáveis pela composição das cadeias globínicas (31). Com elevada prevalência, estima-se que 7% da população mundial seja acometida por hemoglobinopatias; dessas, 40% são portadoras do alelo da HbS (5,31).

As hemoglobinopatias podem ser classificadas em dois grandes grupos. As hemoglobinopatias que alteram a estrutura da hemoglobina resultam da troca aminoácidos e são conhecidas como variantes estruturais da Hb. O outro grupo é caracterizado pela diminuição ou ausência da síntese de uma ou mais cadeias de globina e são denominadas talassemias(4,32–34).

Como já referido anteriormente, a doença falciforme é causada pela variante  $\beta^S$  em estado homozigótico (anemia falciforme) ou em dupla heterozigose com outras mutações, como as de  $\beta$ -tal. .

As mutações que podem acometer o alelo talassêmico, resultam o desequilíbrio na produção das cadeias da hemoglobina. As talassemias são classificadas conforme o tipo de cadeia, cuja a síntese foi prejudicada por mutações. Essas mutações podem ser de base única, deleções ou inserções, e são distribuídas ao longo dos *clusters* alfa ou beta. Assim como a doença falciforme, apresenta ampla variedade de manifestações clínicas (31,36).

### 2.2 Doença Falciforme

A doença falciforme é considerada o transtorno hereditário mais comum em todomundo. A variante do alelo da HbS é caracterizado como autossômico recessivo e a doença é causada, primariamente, pela substituição de único nucleotídeo no gene da globina beta. (35,37,38).

A mutação *missense* no sexto códon do gene da globina beta (*HBB*) leva à troca do sexto aminoácido da cadeia polipeptídica, ácido glutâmico por valina (beta 6 (A3)Glu>Val) (globin.bx.psu.edu). Assim, em vez de uma Hb normal (Hb A), é transcrita a Hb S(39,40).

A substituição do ácido glutâmico (hidrofílico) pela valina (hidrofóbica) faz com que a HbS estabeleça interações hidrofóbicas com outras deoxi-HbS na cadeia  $\beta$ -globina (41). A HbS desoxigenada polimeriza e formam longos filamentos, que alteram a morfologia das hemácias. (26,42,43). Com o acúmulo de  $\text{Ca}^{+}$ , perda de  $\text{H}_2\text{O}$  e perda de  $\text{K}^{+}$ , a hemácia desidrata, sofre oxidação e lesões na membrana que desencadeiam processos de hemólise ou de vaso oclusão (6, 30,44) (Figura 3).

Os indivíduos podem ser acometidos por apenas uma ou mais variantes e o quadro clínico depende tanto da interação entre elas, quanto de moduladores genéticos ( haplótipos da  $\beta^S$ , concentração de HbF e a co-herança de  $\alpha$ -tal) e fatores ambientais. Os fatores ambientais também exercem importante papel na gravidade clínica. Entre eles, estão a condição socioeconômica, acesso à assistência médica dos portadores da doença como, por exemplo, triagem neonatal, imunizações, profilaxia antibiótica, hidratação, terapias de intensificação (hidroxiureia, regime de transfusões crônicas e transplante de medula óssea) (30,47).

Segundo dados do Nupad, a incidência de doença falciforme em Minas Gerais é de 1:1.400 recém-nascidos. Os genótipos da doença falciforme mais comuns em nosso meio são: Hb SS, Hb SC, Hb S $\beta$ -talassemia (Hb S $\beta$ -tal) e HbSD<sup>Punjab</sup>(14,48,49). A detecção das diversas formas da doença falciforme requer diagnóstico laboratorial preciso.

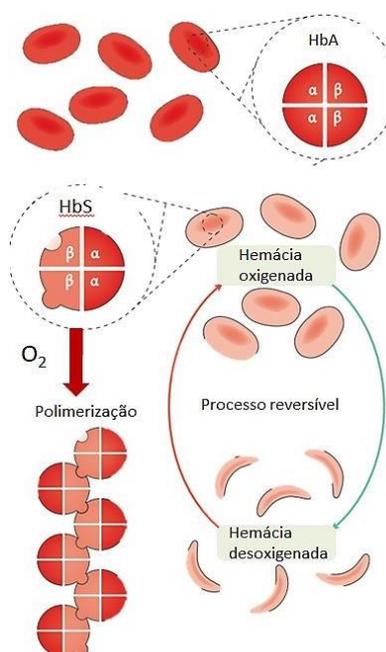


Figura 3 - Representação esquemática do processo de polimerização da HbS em baixa concentração de oxigênio; modificado de KATO, 2018 (35).

### 2.3 Fisiopatologia e manifestações clínicas da doença falciforme

A doença falciforme tem características multisistêmicas que comprometem a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes acometidos. O espectro clínico da doença é muito variável, podendo ir de manifestações leves a formas graves, muitas vezes letais.

O evento primário da doença é a polimerização da hemoglobina S em estado de hipoxia. Esse processo desencadeia a formação de longos polímeros insolúveis no interior da hemácia, aumentando a viscosidade do sangue pela deformabilidade diminuída dos eritrócitos e enrijecimento da membrana celular (15,47).

A polimerização da HbS depende de muitos fatores, incluindo a concentração de HbS, pressão parcial de oxigênio, pH, desidratação celular, aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (35-47). A gravidade das manifestações clínicas é proporcional às concentrações de HbS intracelular e inversamente proporcional a concentração de HbF (50).

Outro fator importante é a desregulação da homeostase de alguns cátions, ocasionando desidratação celular (41,47). Quanto maior a perda de água intracelular, maiores serão os valores da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (47).

A formação do polímero de HbS diminui a vida útil dos eritrócitos, degradação oxidativa e geração de radicais livres. Uma das consequências das alterações intracelulares é a diminuição da sobrevivência das hemácias, ou seja, anemia hemolítica (47,51).

Outro evento característico da doença é o aumento da adesão das hemácias ao endotélio vascular (52,53). O endotélio está envolvido com processos de homeostasia. Quando as hemácias aderem ao endotélio, a exposição ao fator tecidual promove a ativação de cascata de processos inflamatórios (53). Como consequência desses fenômenos, há vasoconstrição, hipercoagulabilidade e diminuição do fluxo sanguíneo (35,47,51).

Tanto a vaso-oclusão como a hemólise têm papel fundamental na gênese das manifestações clínicas da doença falciforme (54). A figura 4 ilustra esquematicamente as relações entre a fisiopatologia da doença falciforme e diversas manifestações clínicas.

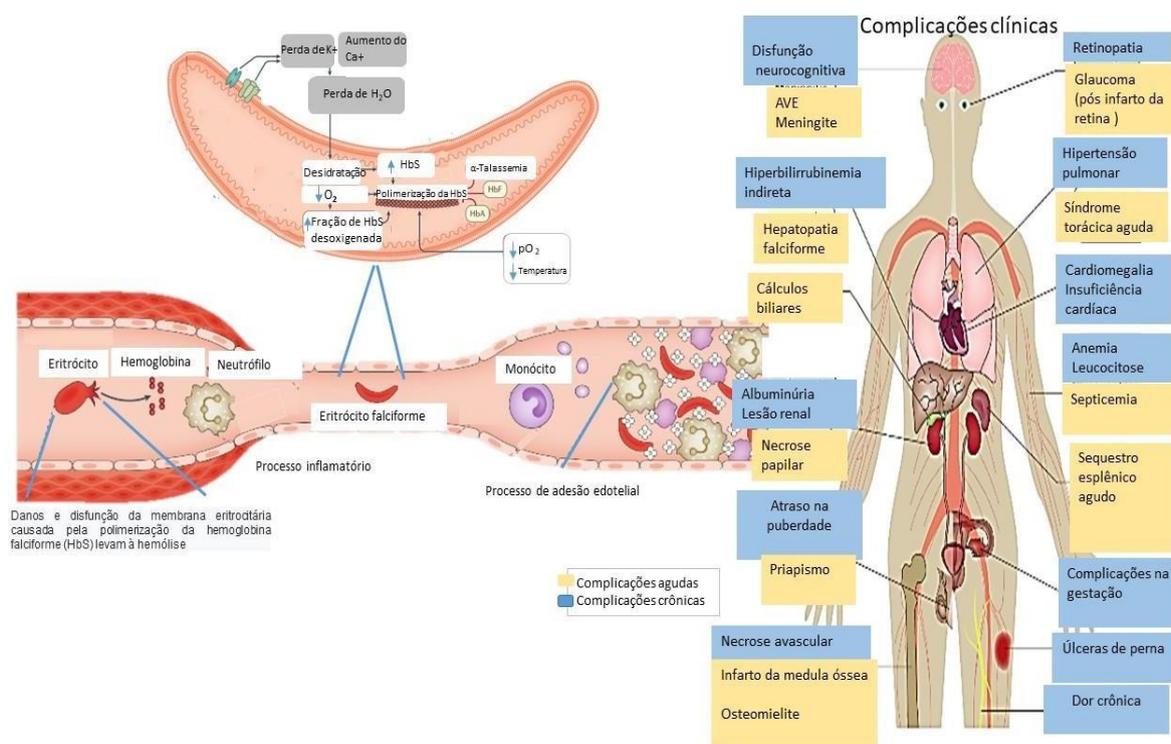


Figura 4 - Representação esquemática entre fenômenos fisiopatológicos e manifestações clínicas nas doenças falciformes; adaptada de KATO, 2018 (35).

Os primeiros sintomas clínicos surgem entre seis e oito meses de vida quando as cadeias  $\gamma$ , constituinte não-alfa da HbF, é quase completamente substituída pela cadeia  $\beta$  contendo a HbS (45). As primeiras manifestações no lactente são a síndrome mão-pé (dor e edema por necrose dos pequenos ossos das mãos e pés), o sequestro esplênico agudo e as infecções (35,55).

A evolução da doença pode comprometer ou provocar falência de múltiplos órgãos. A insuficiência renal, síndrome torácica aguda, insuficiência cardíaca, esplenomegalia, acidente vascular cerebral (AVC), crise de dor e úlcera de perna são algumas das manifestações clínicas observadas na doença, decorrentes da hemólise crônica e da vasocolusão. (45,47,56).

A crise de vaso-oclusão (CVO) é o sintoma mais comum na doença falciforme e é causada principalmente pelo dano tissular isquêmico em resposta à obstrução do fluxo sanguíneo pelos eritrócitos falcizados, acompanhada de inflamação local (6,37,45). As crises algílicas podem ser agravadas por eventos relacionados a febre, desidratação, infecções e hipóxia. Embora, a primeira manifestação de dor entre as crianças seja a dactilite, outras regiões do corpo podem ser afetadas, como os ossos longos e o abdômen (6,47).

A síndrome torácica aguda (STA) é uma das principais causas de hospitalização e óbito entre crianças e adultos (35). Ela é consequente à lesão multifatorial pulmonar e envolve processos de vaso-oclusão, embolia de medula óssea e infecções (35,47). Em decorrência desses processos, o portador da doença falciforme pode apresentar manifestações clínicas como cianose, dor torácica, hipoxemia e dispneia (47).

O AVC é uma das complicações mais graves da doença falciforme e é causa comum de morbidade e mortalidade. Ele ocorre por meio do estreitamento e redução do lúmina da artéria e pela agregação dos eritrócitos falciformes (57,58). O risco de AVC tem prevalência diversa entre os genótipos da doença falciforme, com menor incidência em S $\beta$ -Tal (58,59). A maior incidência de AVC nos indivíduos com S $\beta$ -Tal ocorre nos pacientes com S $\beta^0$ -Tal. A indicação do exame de *Doppler* transcraniano (DTC) para esse subtipo de doença falciforme contribui para o diagnóstico precoce do risco de AVC. Segundo dados do Ministério da Saúde, a triagem precoce do risco de AVC em crianças com doença falciforme, juntamente com o tratamento de transfusão, consegue modificar o prognóstico e qualidade de vida desses pacientes (60).

A crise de sequestro esplênico agudo (SEA) tem como componentes anemia grave, pelo aprisionamento de sangue no baço, e a redução da contagem de reticulócitos (47,61,62). É mais frequente em crianças entre 6 meses e 5 anos de idade, sendo a segunda causa de óbito entre elas, principalmente pelo risco de choque hipovolêmico (10,62). A esplenomegalia em crianças com HbSS tende a regredir após os seis primeiros meses de vida, mas em pacientes portadores de S $\beta$ -tal pode ser persistente após esse período, levando a quadro de hiperesplenismo crônico (63,64).

## 2.4 S/beta-talassemia

Conforme já assinalado, o gene  $\beta^S$  teve origem nos continentes africano e asiático. No Brasil, o principal canal de introdução do gene da HbS foi o comércio de escravos durante o período colonial (6). Já os alelos da  $\beta$ -Tal foram introduzidos no Brasil por meio das imigrações europeias e asiáticas, bem como pelos escravos africanos.

A S $\beta$ -Tal é caracterizada pela coexistência de um alelo  $\beta^S$  e um alelo  $\beta$ -talassêmico (49,65). A coexistência dos dois alelos leva a uma variedade de fenótipos clínicos e hematológicos (49). O fenótipo clínico depende principalmente do tipo de alelo beta talassêmico herdado (66–68). Quando a mutação existente no alelo  $\beta$ -talassêmico determina a completa inativação do *HBB*,

a doença falciforme resultante é conhecida como  $S\beta^0$ -Talassemia ( $S\beta^0$ -Tal) e a gravidade clínica tende a ser semelhante à da anemia falciforme (67,69). Por outro lado, quando a mutação do alelo  $\beta$ -talassêmico leva à diminuição da transcrição do *HBB*, a doença falciforme resultante é conhecida como  $S\beta^+$ -Talassemia ( $S\beta^+$ -Tal), caracterizada por amplo espectro de gravidade clínica, dependente do nível de produção de HbA (66,67,70–72). Semelhante ao que ocorre na anemia falciforme, a fisiopatologia de HbS- $\beta$ Tal está ligada também a polimerização da HbS e a outros fatores moduladores como a concentração de Hb S e os níveis de HbF (73). Na  $S\beta^+$ -Tal, a concentração de HbA interfere na concentração de HbS, no processo de polimerização da HbS e, como consequência, pode reduzir o dano celular e a ocorrência de manifestações clínicas (73).

Geralmente, pacientes com  $S\beta$ -Tal apresentam níveis mais baixos de VCM, HCM, CHCM e a contagem de células falciformes irreversíveis inferior à da anemia falciforme (72–74). Em estudo realizado na população grega, foi observado que os indivíduos com  $S\beta$ -Tal apresentaram maior contagem de glóbulos vermelhos em comparação aos portadores de anemia falciforme. O grupo com  $S\beta^0$ -Tal apresentou contagem de reticulócitos mais elevada e níveis superiores de HbF (72). Em razão disso, crianças portadoras de  $S\beta$ -Tal possuem quadros clínicos que variam de fenótipos assintomáticos a quadros mais graves, necessitando, inclusive, de hemotransfusões frequentes (75). Em pacientes com  $S\beta$ -Tal, os níveis de HbF podem ser mais elevados em relação aos de pacientes com HbSS (70). A HbF estaria associada aos aspectos clínicos mais brandos; quanto maior o nível de HbF, menores seriam os sintomas, em concordância com outros genótipos da doença falciforme (64,70).

Todos esses estudos, entretanto, pecam por não conterem de forma parcial, os diversos genótipos da talassemia beta envolvidos.

Na triagem neonatal, o perfil das HbS de recém-nascidos com  $S\beta$ -Tal pode ser de dois tipos: FS ou FSA. O primeiro perfil, associado ao genótipo  $S\beta^0$ -Tal e a forma mais grave de  $S\beta^+$ -Tal com baixa produção de HbA, é idêntico ao dos recém-nascidos com anemia falciforme. A distinção entre HbSS e Hb  $S\beta^0$ -Tal no período neonatal requer a utilização de testes moleculares (76).

A observação de níveis elevados de HbA<sub>2</sub>, microcitose e hipocromia podem também contribuir para o diagnóstico diferencial entre os genótipos HbSS e  $S\beta$ -Tal (73,77). A co-herança de talassemia alfa torna essa distinção mais difícil. Além dos testes laboratoriais, estudo familiar

pode ajudar no diagnóstico diferencial entre Hb SS e S $\beta$ -Tal (45,78,79). A tabela 1, adaptada de (59) mostra as principais características laboratoriais da S $\beta$ -Tal.

Tabela 1 – Características laboratoriais da S $\beta$ -Tal

	HbS $\beta^0$ -Tal	HbS $\beta^+$ -Tal
HbA	ausente	1,0 - 45,0%
HbS (%)	50-85	55-75
Hb Total (g/dL)	8,0 (7,0-10,0)	11,0(8,0-13,0)
HbA <sub>2</sub> (%)	4,0-6,0	3,0-8,0
HbF (%)	2.0-30.0	1.0-20-0
Reticulócitos (%)	8 (3-18)	3(1.5-6)
VCM (fL)	69	76
Hemólise	presente	presente
Crise vaso oclusiva	presente	presente
Morfologia	Acentuada hipocromia, microcitose  e hemácias falcizadas	Discreta hipocromia, microcitose  e hemácias falcizadas

Adaptada de BRASIL, 2012 (59)

A HbS $\beta^+$ -Tal associada a baixos níveis de HbA parece comportar-se clinicamente como HbS $\beta^0$ -Tal e HbSS (73), embora existam poucos estudos comparativos. Algumas mutações descritas na posição IVS-1-5 também produzem um fenótipo grave de HbS $\beta^+$ -Tal (71). Essa região faz parte da sequência de consenso doadora do éxon 1 e, quando mutada, diminui a eficiência de processamento do mRNA (71,73). Já a mutação IVS-I-110 G>A ativa um sítio acceptor alternativo de 19 pares de base, antes do acceptor normal AG do IVS-I, criando *splicing* alternativo. Nessa mutação, cerca de 10 % do mRNA permanece funcional (71,80).

O portador de S $\beta$ -Tal pode ser mais propenso a alguns tipos de manifestações clínicas em relação as outras formas de doença falciforme. Os efeitos da talassemia nos eritrócitos

falciformes, como a microcitose e a hipocromia, reduzem os efeitos da hemólise em comparação com a Hb SS, com taxas de morbidade e mortalidade mais reduzidas (10,54). Entretanto, as complicações associadas à viscosidade do sangue podem ser mais prevalentes e predispor a eventos de vaso oclusão (73,81).

A crise do sequestro esplênico agudo é uma das principais causas da morbidade e mortalidade em crianças com S $\beta$ -Tal (82). O grau de comprometimento da função esplênica parece ser mais proeminente em pacientes com S $\beta^+$ -Tal quando comparados com os S $\beta^0$ -Tal (82,83), mas, novamente, os genótipos envolvidos não estão claramente explicitados nessas publicações.

A esplenomegalia pode ser mais comum em indivíduos com Hb S $\beta^0$ -Tal do que nos HbSS, e pode persistir até a idade adulta (70,73). A síndrome torácica aguda acomete mais indivíduos com o genótipo S $\beta^0$ -Tal (73,83).

Alguns autores, classificam a S $\beta^+$ -Tal de acordo com a quantidade de HbA produzida: tipo I entre 1 e 7% de HbA; tipo II entre 7 e 14%; e tipo III entre 14 a 25% (67). Recentemente foi observado um novo tipo S $\beta^+$ -Tal caracterizado pelo nível de HbA de 25 a 45% e um fenótipo mais leve (tipo IV) (84). Conforme já assinalado, os níveis de produção de Hb A estão associados com o tipo e a localização das mutações do alelo da beta talassemia. Genótipos como o IVS-I-110 e IVS-I-6 produzem concentrações de HbA entre 8,0 a 15% e 20 a 25%, respectivamente (71,72).

A tabela 2 resume os principais estudos disponíveis na literatura atual sobre a S $\beta$ -Tal. A maioria dos estudos não avaliou todos os parâmetros que caracterizam a doença em conjunto, tais como fatores genéticos, hematológicos e clínicos, como o presente estudo.

Tabela 2- Síntese dos principais estudos sobre S $\beta$ -Tal.

Referência	Local da casuística	Número amostral	Alfa talassemia	Haplótipos $\beta/S$ / $\beta/tal$	Mutações $\beta/tal$	Síntese dos principais achados clínicos e hematológicos do estudo
Serjeant (1973) (70)	Jamaica	56 S $\beta$ -tal	_____	_____	_____	Os eventos clínicos mais graves como cardiomegalia, hepatomegalia, úlceras de perna e crises de dor em S $\beta^0$ -Tal. Os portadores S $\beta^+$ -Tal apresentaram maior frequência de esplenomegalia do que os S $\beta^+$ -Tal.
Steinberg (1976) (85)	Estados Unidos	13 S $\beta$ -tal 5 HbSS	_____	_____	_____	Os dois genótipos apresentaram frequência de esplenomegalia e contagem de reticulócitos semelhantes. Os níveis de HbA foram, em média, de 20-30%
Serjeant (1979) (69)	Jamaica	41 S $\beta^0$ -Tal 123 HbSS	_____	_____	_____	Níveis similares de HbS em ambos os genótipos avaliados. Indivíduos S $\beta^+$ -Tal apresentaram aumento dos valores da HbA <sub>2</sub> e valores menores de VCM, HCM. Maior persistência de esplenomegalia foi observada em pacientes S $\beta^+$ -Tal.
Zago (1980) (12)	Brasil	14 S $\beta$ -tal 26 HbSS	_____	_____	_____	Comparação dos dois grupos revelou a maior ocorrência de esplenomegalia nos indivíduos S $\beta^+$ -Tal.
Bienzle (1983) (74)	Libéria	20 S $\beta$ -tal	_____	_____	_____	Curso clínico mais brando, com baixa frequência de esplenomegalia e hepatomegalia. Contagens de reticulócitos foram apenas ligeiramente aumentadas. Média de HbA de 25%
Atweh e Forget (1987) (81)	Estados Unidos	1 (relato de caso)	$-\alpha/\alpha\alpha$	_____	-29 (A>G)	Embora a mutação -29 (A>G) TATA box seja descrita com aspectos clínicos leves, no estudo foi observado que o paciente tinha manifestações clínicas graves, possivelmente devido ao aumento de viscosidade pela co-herança de alfa talassemia.
Kulozik (1991) (64)	Índia	17 S $\beta$ -tal famílias 131 HbSS	(14 $-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$ , n=2 $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ , n=2 $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ , n=2 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ , n=3 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ , n=1 $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ , n=7	$\beta^S$ Asiático $\beta/Tal I$ (15 casos)	IVS1-5 G>C (todos)	O genótipo S $\beta^+$ -Tal foi caracterizado por maiores níveis de HbA <sub>2</sub> , menor VCM e HCM em comparação a HbSS. A expressão clínica foi semelhante à Hb SS. Frequência de alfa talassemia: 47% em Sbeta tal e 32 % em HbSS.
Christaki (1991) (72)	Grécia	49 S $\beta$ -Tal (28 S $\beta^0$ -Tal e 21 S $\beta^+$ -Tal); 30 HbSS.	_____	_____	CD39 (n=15) IVS-I-1 (n=4) <i>Frameshift</i> códon (n=4) IVS-II-745 (n=4) IVS-I-110 (n=13) IVS-I-6 (n=3)	Níveis mais baixos de VCM e HCM nos pacientes com Sbeta tal em relação a SS. Prevalência de variáveis clínicas muito semelhantes entre SS, S $\beta^0$ e S $\beta^+$ -Tal. Número de S $\beta^+$ -Tal leve (IVS-I-6) muito pequeno para cálculos estatísticos.
Barrios (1991) (86)		12 S $\beta^+$ -Tal	_____	_____	_____	Observado baixa incidência de episódios vaso-oclusivos e não houve perda da função esplênica.
Bashir (1992) (87)	Jordânia	20 S $\beta^0$ -Tal e 30 S $\beta^+$ -	_____	_____	_____	Pacientes com HbA maior que 30% apresentaram um curso clínico mais brando, menos episódios de dor e necessidade de transfusão diminuída

		Tal					
Divoky (1993) (88)	Sicilia	Um paciente			-92 C>T	Quadro clínico leve	
Boletini (1994) (89)	Albânia	8 S $\beta$ -tal, 15 HbSS e 29 talassemia	_____	Benin	IVS-1-110 G>A n=7 1 não determina do	Caracterizadas as principais mutações que causam beta talassemia na região estudada. Média de HbA nos casos Sbeta foi 8.7%. Não há descrição clínica.	
Altay (1997) (90)	Turquia	19 S $\beta^+$ -Tal 12 S $\beta^0$ -Tal	_____	_____	IVS1-110 (?) n=14 IVS-I-1 (?) n=6 IVS-II-1 (?) n=3 IVS-II-745 n=5 CD8/9 fs (?) n=1 CD39 (?) n=1 CD 44 (?) n=1	Embora os valores de HbF fossem maiores na S $\beta^0$ -Tal, de modo geral não foram observadas diferenças estatisticamente significante nos valores hematológicos entre S $\beta^+$ -Tal e S $\beta^0$ -Tal. Não havia S $\beta^+$ leve	
Donaldson (2000) (91)	Jamaica	132 S $\beta^+$ -tal	_____	_____	-29 (A>G) n=51 -88 (C> T) n=19 PolyA (T>C) n=15 IVS1-5 (G>C) n=9 Mais 6 mutações com apenas um paciente, cada	A mutação IVS-I-5 (G>C) teve um fenótipo hematológico mais grave e baixos níveis de HbA (5-7%) do que as outras três mais comuns. Maiores níveis de HbF foram observados em pacientes com mutações na região promotora de <i>HBB</i> .	
Loukopoulos (2000) (92)	Grécia	55 S $\beta$ -tal 14 HbSS	_____	_____	CD 39 C>T, n=25 IVSI-1, n=5 IVS II-1, n=3 IVS1-110 G>A, n=18 IVS-II-745, n=2 Frameshift éxon 2, n=2	Houve redução muito significativa da incidência de manifestações clínicas (escore de gravidade). Relato de 3 pacientes que desenvolveram úlceras de pernas.	
Schmugge (2008) (93)	Congo	2 irmãos S $\beta$ -tal	- $\alpha$ 3.7/ $\alpha\alpha$ ; $\alpha$ 3.7	- $\alpha$ 3.7/- Benin	CD30 AGG>CGG (Arg>Arg). Mutaçao na região de <i>splicing</i> IVS-I (-2) A>C	O probando com a interação de alfa talassemia - $\alpha$ 3.7/- $\alpha$ 3.7 apresentou Hb A mais elevada e menos eventos de crise vaso-oclusiva.	
Mukherjee (2010) (65)	Índia	21 S $\beta$ -tal	47,4% $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ 31,6% - $\alpha/\alpha\alpha$ 21,0% - $\alpha/-\alpha$	Árabe- indiano	IVS-1-5 (G>C), n=10 CD 15 (G>A), n=6	Nos casos graves, as apresentações clínicas foram caracterizadas por crises vaso oclusivas no abdômen, ossos e tórax, com regulares transfusões. A hepatoesplenomegalia foi observada em ambos os fenótipos, com 87,5 % nos casos mais graves e 53,8% nos casos mais leves .	

Serjeant (2011) (67)	Jamaica	261 S $\beta$ -tal	—	—	<p>IVS-II-849 A&gt;G, n=31 Frameshit CD6, n=10 IVS-II-1 G&gt;A, n=7 CD30 G&gt;C, n=10 CD39 C&gt;T, n=4</p> <p>Outros frameshift, n=8 IVS-I-5 G&gt;C, n=26 -29 (A&gt;G), n=99 -88 (C&gt;T); n=36 PolyA (T&gt;C), n=23 IVS-II-654 C&gt;T, n=2 IVS-I-6 T&gt;C, n=2 CD24 T&gt;A, n=2</p>	Os níveis de Hb A <sub>2</sub> foram menores em pacientes com a mutação IVS-II-1 (G>A). O aumento dos níveis de Hb A em indivíduos Hb S $\beta$ <sup>+</sup> -tal foi associado à menores níveis de Hb A <sub>2</sub> e Hb total. Os níveis de Hb F, VCM e HCM foram mais altos em indivíduos com a mutação -88 C>T e menores na mutação PolyA (T>C). A IVS-I-5 causadora de S $\beta$ <sup>+</sup> -Tal tipo I comportou-se como uma síndrome grave semelhante à S $\beta$ <sup>+</sup> -Tal. A esplenomegalia <5 anos foi mais frequente na mutação -29 (A>G).
Rigano (2013) (57)	Itália	34 S $\beta$ <sup>-</sup> Tal 67 S $\beta$ <sup>+</sup> Tal	—	—	—	O AVC ocorreu durante o tratamento de HU em 37,5% dos pacientes (39/104); 46,1% destes ocorreram em pacientes com S $\beta$ <sup>-</sup> -Tal e 53,9% em S $\beta$ <sup>+</sup> -Tal. A incidência de acidente vascular cerebral foi de 0,6 eventos por 100 pacientes ano. O infarto cerebral silencioso ocorreu em 14,4% S $\beta$ <sup>-</sup> -Tal e 16,3% em S $\beta$ <sup>+</sup> -Tal. O uso da HU foi efetivo para redução de crises de dor (6 vezes menos) e hospitalizações (8 vezes menos)
Amid (2015) (94)	Canadá	1 (relato de caso) S $\beta$ -tal	- $\alpha$ <sup>3.7</sup> / $\alpha\alpha$	—	Deleção na região $\beta$ LCR (4860 pb)	Relato de caso de um probando que na triagem neonatal apresentou perfil de traço falciforme. Aos cinco anos de idade apresentou sequestro esplênico. Posteriormente com resultado de HPLC Hb A 19,4%, Hb S 72,7% e Hb A <sub>2</sub> 2,6%) e através de testes moleculares foi confirmado como S $\beta$ <sup>-</sup> -Tal.
Belisário (2015) (79)	Brasil	4 S $\beta$ <sup>+</sup> -tal	—	—	-92 (C>T), n=2 IVS-II-844/ IVS-II-839(T>C), n=2	Fenótipos clínicos leves e assintomáticos. Proposta de nova classificação de acordo com o nível de HbA observada (25 a 45%).
Yadav (2016) (95)	Índia	92 S $\beta$ -tal e 404 HbSS	—	—	—	Prevalência de esplenomegalia 82,6 % para S $\beta$ -Tal e 68,8% em HbSS. A distinção entre os dois grupos feita apenas com estudo familiar

Gasparini (2016) (96)	Argentina	1 (relato de caso)	—	—	IVS-I-110 (G > A)	Observou-se anemia moderada, hipocromia, microcitose, crise de dor lombar e torácica.
Vincent (2016) (66)	Nigéria	100 S $\beta$ -tal	—	—	—	Prevalência da S $\beta$ -tal na Nigéria foi de 0,6%. Dos 100 participantes do estudo, 6 identificados anteriormente como HbSS, foram reavaliados como S $\beta$ -Tal.
Benites (2016) (97)	Brasil	31 S $\beta$ -tal <sup>0</sup> e 15 S $\beta$ -tal+	—	—	IVSI-110 G>A, n=4 CD39 C>T, n=10 IVS-I-6 T>C, n=2  (apenas 16/46 foram determinados)	Pacientes S $\beta^+$ -Tal apresentaram maior grau de comprometimento hematológico quando comparados com os pacientes com S $\beta^+$ -Tal. Os pacientes com S $\beta^+$ -Tal nesta coorte foram 4,9 vezes mais propensos à ocorrência de síndrome torácica aguda do que os pacientes com S $\beta^+$ -Tal. O principal problema do estudo é o número muito baixo de genotipagem das mutações de Beta talassemia.
Adekile (2017) (68)	Kuwaiti	25 S $\beta^0$ -tal 7 S $\beta$ -tal <sup>+</sup> 70 HbSS	- $\alpha$ / $\alpha$ ou - $\alpha$ / $\alpha\alpha$  52,3% em S $\beta$ -tal e 25,8% em HbSS	—	CD 39 C>T, n=8 IVS-I-1 G>A, n=6 IVS-II-1 G>A, n=3 IVS-I-5 G>C, n=2  CD 8/9 ins G, n=2 Outros S $\beta^0$ , n=4 (4x1) IVS-I-110 G>A, n=5  -28 (A>C), n=1 IVS-I-6 T>C, n=1	Episódios mais intensos de dor foram mais frequente em pacientes S $\beta$ -tal em comparação com os HbSS. Não houve diferenças nas frequências de síndrome torácica aguda, cálculos biliares e transfusão de sangue entre HbSS e S $\beta$ -tal, mas os pacientes com genótipo de S $\beta^+$ -Tal não receberam transfusão. Não houve diferença na ocorrência de dor ou uso de HU entre os pacientes S $\beta^+$ -Tal e S $\beta^+$ -Tal. Não foi observado associação significativa de alfa talassemia na gravidade de dor. Notar “n” pequeno de S $\beta^+$ -tal, a maioria IVS-I-110.
Di Maggio (2018) (98)	Itália	54 S $\beta^+$ -Tal, 56 S $\beta^+$ -Tal  25 HbSS	—	—	—	Resposta similar ao uso de HU em pacientes com genótipos de HbSS, S $\beta^+$ -Tal e S $\beta^0$ -Tal
Dash (2018) (99)	Índia	60 S $\beta$ -Tal	75% $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ 21,6% $\alpha\alpha/\alpha^{-3.7}$ 1,6% $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$  1,6% $\alpha\alpha/\alpha^{4.2}$	$\beta^S$ -Árabe indiano  $\beta$ -Tal 42% tipo I 36% tipo II  8% tipo III	IVS-I-5 G>C, n=60	Os indivíduos com $\alpha\alpha/\alpha^{-3.7}$ tiveram aumento significativo de HbA <sub>2</sub> , HbF e baixos níveis de HbS. A associação entre a mutação IVS-I-5 (G>C) e o haplótipo árabe indiano também demonstrou aumento significativo de HbF. As manifestações clínicas mais graves foram observadas no haplótipo $\beta$ -Tal tipo III, como esplenomegalia e anemia dependente de transfusão.

Assim como em outros subtipos de doença falciforme, o tratamento com a hidroxiureia também é utilizado em pacientes S $\beta$ -Tal que possuam os critérios de indicação para seu uso. O mecanismo de ação da hidroxiureia consiste no aumento seletivo na produção da HbF e redução concomitante da HbS intracelular e sua polimerização (92,98,100). Essas mudanças celulares facilitam a microcirculação, diminuem a hemólise e aumentam a concentração de Hb total (92). Além disso, observa-se redução dos níveis de leucócitos, plaquetas, reticulócitos e moléculas de adesão do endotélio, bem como aumento na produção de óxido nítrico (60,92). O tratamento com a hidroxiureia também modula as manifestações clínicas, reduzindo as crises de vaso-oclusão e de síndrome torácica aguda, contribuindo para sobrevida mais prolongada dos pacientes (98,101). A hidroxiureia pode, também, prevenir manifestações neurológicas, crises de sequestro esplênico e reduzir a necessidade de hemotransfusão (60).

Em alguns casos, recomenda-se o uso de transfusão sanguínea. Para sua prescrição, é necessário seguir algumas diretrizes de indicação e de contra-indicação. Essa intervenção é indicada, principalmente, para os pacientes que apresentam crise aplástica, crise hiper-hemolítica, complicações anêmicas graves, nas crises de sequestro esplênico, priapismo, AVC, síndrome torácica aguda e em procedimentos pré-operatórios (60,102).

## **2.5 Mutações do alelo $\beta$ -Talassêmico**

Mais de 300 diferentes tipos de mutações de  $\beta$ -Tal já foram descritas em todo o mundo (71,103). Essas mutações estão distribuídas ao longo do *cluster* do gene da beta globina, compreendendo a região promotora, TATA Box, três éxons, dois íntros e a região de sinalização de poliadelinação, como esquematizado na figura 5. O fenótipo associado depende da localização e da natureza da mutação genética (71).

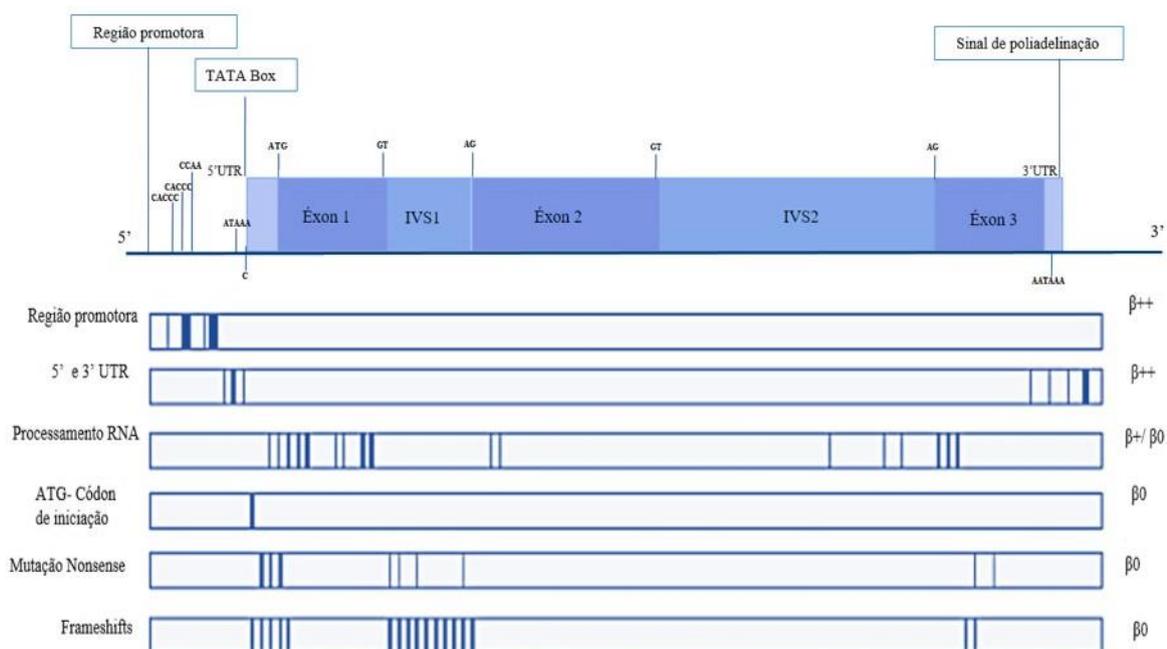


Figura 5 - Ilustração das regiões 5'UTR e 3'UTR gene da beta globina, mostrando as regiões sequenciadas para identificação das mutações da talassemia beta heterozigótica associada à Hb S. A linha horizontal representa as categorias das mutações e as linhas verticais representam os locais das mutações. Adaptado de THEIN, 2013 (71)

Genericamente, as mutações de  $\beta$ -Tal podem afetar a transcrição da cadeia beta, o processamento do RNA mensageiro (mRNA) ou a tradução do RNA. A maioria das mutações são de apenas um nucleotídeo no gene *HBB* ou próximas a regiões flangeadoras do gene. Mais raramente, estão presentes pequenas deleções ou inserções (71). A tabela 3 resume as principais categorias das mutações descritas para  $\beta$ -Tal.

As mutações que afetam a transcrição estão na região promotora e geralmente causam pequena deficiência na síntese da globina beta e, portanto, um fenótipo mais leve (71,104). A maioria dessas mutações está localizada na região de TATA box ou nas posições -90 a -105 das sequências CACACCC (73,77).

As mutações que afetam o processamento do RNA estão relacionadas com a substituição de bases nas regiões intrônicas, exônicas ou de poliadenilação e interferem no processamento do RNA (*splicing* e poliadenilação), ocasionando fenótipos variáveis de  $\beta^0$ -Tal ou  $\beta^+$ -Tal (71,80). As mutações nas sequências de consenso e de junção de *splicing* podem produzir fenótipos leves ou graves, em decorrência da redução da eficiência do *splicing* (71,105,106). As mutações que afetam os dinucleotídeos GT ou AG na região exón-íntron alteram a junção de “emendas”

normais e abolem o *splicing*, de forma que o mRNA é degradado e o fenótipo resultante é  $\beta^0$ -Tal (71,107).

Tabela 3 - Tipos de mutações e mecanismos que influenciam a produção da hemoglobina

I. Mutações transcricionais	II. Mutações processamento de RNA	III. Mutações de tradução RNA
Elementos reguladores da região promotora 5'UTR	Junções de <i>splicing</i> Sequência consenso	Códon de iniciação Códon de terminação
Sítios críticos de <i>splicing</i> nos éxons	Sítios críticos de <i>splicing</i> nos éxons	<i>Frameshift</i>
	Sítios críticos de <i>splicing</i> nos íntrons 3'UTR	Mutações <i>missense</i> , resultando em hemoglobinas instáveis
	Clivagem de RNA - Sinal de poliadenilação	

Adaptado de THEIN, 2017 (80)

A  $\beta^0$ -Tal também pode ser causada por mutações que afetam de forma significativa o processo de tradução do códon de iniciação (ATG), ou por mutações *nonsense* que geram *stop* códon prematuro, encurtando a molécula da beta globina, tornando-a não funcional (71). Exemplo típico dessa última situação é a mutação do códon 39, a mais frequente nas regiões sul e sudeste do Brasil (15,51–53).

As mutações com mudança de leitura ou *frameshift* produzem sequências diferentes da codificação normal da proteína. Elas promovem a mudança de leitura para o mRNA e modificam o tamanho da cadeia da proteína traduzida, pois acabam resultando num código de parada (*stop codon*) a 3' do(s) nucleotídeo(s) deletados/inseridos (71,80).

A frequência mais elevada de S $\beta$ -Tal nas regiões do Mediterrâneo e do Oriente Médio está de acordo com as regiões de maior prevalência dos alelos  $\beta$ -Tal (68). A distribuição e a frequência dos alelos S $\beta$ -Tal variam de acordo o grupo étnico. Esses alelos foram levados para outras populações pelo fluxo gênico (67,68,80).

Os alelos  $\beta$ -talassêmicos em cada região brasileira anteriormente estudada, apresentou características próprias quanto à frequência relativa, refletindo a composição das populações parentais e a intensidade de miscigenação (9,16,17,19–21,111). A tabela 4 resume as principais mutações de  $\beta$ -talassemia distribuídas por regiões do Brasil. Alguns desses estudos não realizaram o sequenciamento, utilizaram técnicas como hibridização, PCR-AE (PCR-alelo específica), PCR-ARMS (PCR- sistema de amplificação refratário à mutação) e PCR-RFLP. Além disso, alguns desses estudos apresentam número reduzido de pacientes avaliados.

Tabela 4 - Distribuição de mutações dos alelos beta talassêmicos em algumas regiões do Brasil

		Nordeste				Norte	Sudeste					Sul
		Fortaleza	Recife	Bahia	Rio Grande do Norte	Amazonas	São Paulo	Franca	Campinas	Ribeirão Preto	Rio de Janeiro	Porto Alegre
		15 alelos (112)	86 alelos (110)	1 alelo (18)	39 alelos (19)	35 alelos (113)	70 alelos (114)	25 alelos (106)	40 alelos (115)	57 alelos (107)	38 alelos (111)	116 alelos (108)
Genótipo	Mutação											
	IVSI-(-1) G>C	–	–	–	–	–	–	–	5,7%	–	–	0,86%
	IVS-I-1(G>A)	14,3%	15,1%	–	53,8%	10,8%	4,3%	–	–	–	11,1%	12,9%
	IVS-II-1 (G>A)	–	–	–	–	2,7%	–	–	–	–	–	–
	IVS-I-5 (G>C)	–	9,3%	–	–	2,7%	–	–	–	–	–	–
β°	Códon 15	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2,8%	2,58%
	Códon 30	–	1,1%	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Códon 39	21,4%	3,5%	–	2,6%	21,6%	54,3%	44,0%	64,3%	47,0%	13,9%	50,86%

	Códon 44 (-C )	-	-	1,0%	-	-	-	-	-	-	-	
	IVS-I-5 (G>A)				27,0%					5,5%	1,72%	
	IVS-I-6 (T>C)	35,7%	62,8%	-	53,8%	10,8%	18,6%	36,0%	7,1%	27,0%	33,3%	9,5%
	IVS-I-110 (G>A)	-	8,2%	-	5,1%	2,7%	18,6%	16,0%	20,0%	15,0%	16,7%	18,1%
	IVS-II-745 (C>G)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,5%	-
$\beta^+$	Códon 24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,8%	-
	-88 C>T	-	-	-	-	16,8%	-	-	-	-	2,8%	-
	-29 A>G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,5%	0,86%
	+20 C>T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,5%	1,72%
$\beta^\circ/\beta^+$	IVS-II-2 (T>A).	-	-	-	-	2,7%	-	-	-	-	-	-
	Códons 77/78 (-C)	-	-	-	-	2,7%	-	-	-	-	-	-

## 2.6 Origem e distribuição geográfica dos haplótipos $\beta^S$ e $\beta$ -Tal

### 2.7.1 Haplótipos $\beta^S$

De acordo com a principal hipótese vigente, o alelo  $\beta^S$  teria surgido independentemente em cinco momentos diferentes na história, com origem multicêntrica (115). Sua expansão e prevalência atual associam-se a maior ou menor prevalência da malária há cerca de 10 mil anos. Essa doença parasitária, por sua letalidade, causou pressão seletiva positiva entre os indivíduos com traço falciforme no continente africano e asiático, uma vez que as hemácias com Hb S parecem ser, realmente, mais resistentes ao parasitismo pelo *Plasmodium.sp* (39,116–118).

Variações polimórficas de nucleotídeo único (SNP), não-randômicas, chamadas de haplótipos, associam-se à mutação do alelo  $\beta^S$ . Elas encontram-se em desequilíbrio de ligação com a mutação  $\beta^S$  no *cluster* do *HBB* e estão presente em um trecho de 63 kb de DNA (73,119).

A determinação dos cinco padrões de haplótipos baseia-se, na origem do conhecimento sobre os mesmos, na identificação da presença (+) ou ausência (-) de sítios polimórficos sobre os quais agem enzimas de restrição. Essas enzimas fragmentam o DNA e são mais comumente detectadas por reações de *PCR-RFLP* (115,116,120). A figura 6 mostra a localização dos *SNPs* no agrupamento da beta globina e as regiões de reconhecimento das endonucleases por meio de clivagem do DNA, para a determinação dos haplótipos. Padrões divergentes dos cinco haplótipos clássicos são classificados como “atípicos”.

Os haplótipos  $\beta^S$  são nomeados de acordo com a região geográfica onde predominam: quatro têm origem africana (Senegal, Benin, CAR ou Bantu, e Camarões) e um, origem asiática (Árabe-indiano) (39,121,122), como demonstrado na figura 7.

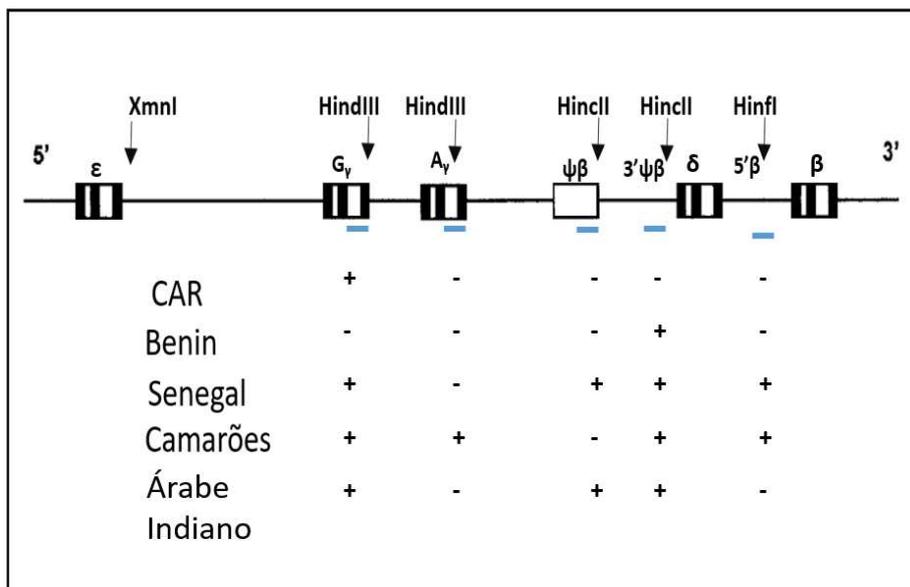


Figura 6 -Representação dos cinco principais padrões de haplótipos  $\beta^S$  com polimorfismos e fragmento de restrição; com modificações de SUTTON, 1989 (119) . O sítio XmnI está em forte desequilíbrio de ligação com o sítio HincII em  $\psi\beta$  e não necessita genotipagem distinta. O sítio Hinc II está localizado a 5' do gene *HBE*.

A dispersão desses haplótipos por outras populações foi ocasionada pelo fluxogênico das migrações e tráfico de escravos. O estudo dos haplótipos fornece uma melhor compreensão clínica e de ancestralidade nos portadores da doença falciforme (123–125).

Os haplótipos são considerados moduladores da gravidade da doença falciforme, pois alguns dos sítios polimórficos (por exemplo, XmnI na região promotora de *HBG2*, e HincII no gene pseudobeta,  $\psi\beta$ ) parecem ser fatores reguladores da síntese de HbF (124,125). Geralmente, o haplótipo Asiático (positivo nas duas regiões mencionadas) é associado com taxas mais elevadas de HbF e um curso clínico benigno. Em contraste, o haplótipo *Central African Republic* (CAR) ou Bantu cursa com formas mais graves da doença (125,126).

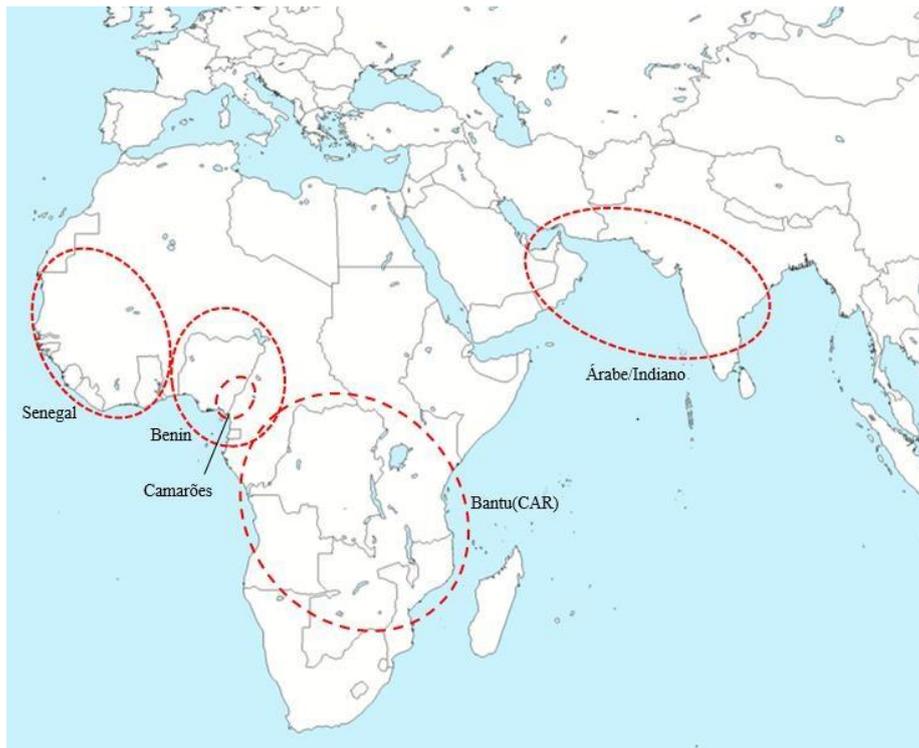


Figura 7- Representação das regiões geográficas de acordo com a predominância dos haplótipos  $\beta^S$ . Adaptado de SUART, 2004 (6).

A distribuição dos haplótipos no Brasil varia em cada região, sendo os mais frequentes CAR e Benin. O haplótipo CAR é mais prevalente nas regiões africanas que hoje correspondem a Angola e Congo, de onde provieram, no período colonial, os escravos para o Rio de Janeiro e região central de Minas Gerais, principalmente nas cercanias de Ouro Preto, então Vila Rica (115,127,128). Já para a Bahia e norte de Minas Gerais, onde predomina o haplótipo Benin, a origem dos escravos situa-se na região da África Ocidental, hoje Gana, Benin, Togo e países adjacentes (129,130).

### 2.7.2 Haplótipos $\beta$ -Tal

Assim como os haplótipos de  $\beta^S$ , os haplótipos de  $\beta$ -Tal também estão em desequilíbrio de ligação com as respectivas mutações  $\beta$ -Tal, estão associados com a origem da mutação e são importantes para estudos antropológicos (120,131). A distribuição desses haplótipos pode variar para cada grupo populacional. O estudo dos haplótipos da beta talassemia é importante para caracterizar a origem e disseminação do alelo beta talassêmico (120,132,133).

Os haplótipos da beta talassemia são comumente determinados por nove padrões de clivagens diferentes ao longo do agrupamento da beta globina, identificados como algarismos romanos, de I a IX (Figura 8)(120,134). Cada sítio polimórfico é caracterizado pela presença (+) ou ausência (-) de clivagem por enzimas de restrição. Os haplótipos  $\beta$ -Tal mais frequentes são o I, II e V (120). Uma única mutação pode estar associada com mais de um tipo de haplótipo, como na mutação IVS-110(G>A), ligada aos haplótipos I, II, IV e V(120,133). Um único haplótipo pode estar associado com mais de um tipo de mutação(120). A heterogeneidade da distribuição dos alelos beta talassêmicos seria explicada pelo processo de recombinação meiótica e de associação aleatória entre eles (120,135).

Estudos anteriores demonstraram que, como esperado, existe associação entre os diversos haplótipos característicos de diversas populações com as mutações da beta talassemia que lá tiveram sua origem e se expandiram pela pressão seletiva da malária, semelhantemente ao que ocorreu com a expansão do alelo  $\beta^S$  (120,131,132,134,136). No caso da beta talassemia, a diminuição da concentração da hemoglobina A nas hemácias de indivíduos com talassemia menor (forma heterozigótica da talassemia) não é favorável aos parasitas da malária e esses indivíduos, no passado da humanidade, foram positivamente selecionados, conforme a lei de Darwin (137).

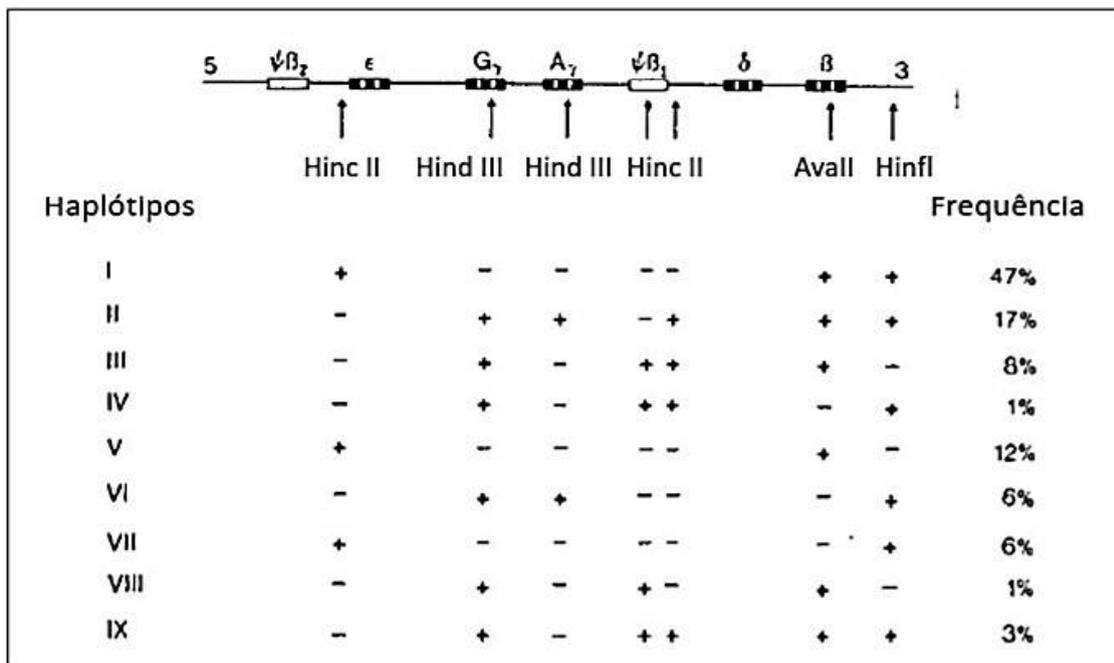


Figura 8-Representação dos haplótipos  $\beta$ -Tal com os diversos sítios polimórficos detectados por enzimas de restrição, bem como sua frequência relativa. Modificado de ORKIN, 1982(120).

## 2.7 Interação com Alfa Talassemia

A alfa talassemia é uma hemoglobinopatia caracterizada pela redução ou ausência da síntese da cadeia  $\alpha$ , em decorrência de deleção, ou de outros processos menos comuns, de um ou mais genes HBA, no processo de crossing-over desigual na meiose (23,138,139). Na espécie humana, existem quatro genes alfa (dois HBA1 e dois HBA2). A gravidade do fenótipo na alfa talassemia reflete o número de genes da  $\alpha$  globina afetados (138,140).

Os genótipos são classificados de acordo com o número de genes funcionais HBA. Os genótipos podem apresentar as seguintes composições;  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$  (normal),  $-\alpha/\alpha\alpha$  (portador silencioso),  $-\alpha/-\alpha$  ou  $--/\alpha\alpha$  (traço alfa-talassêmico),  $-\alpha/--$  (doença da hemoglobina H), e  $--/--$  (hidropsia fetal) (141,142). A interação com a alfa talassemia pode modular o quadro clínico na doença falciforme e resultar em variedades do espectro clínico na doença.

Os principais parâmetros hematológicos que podem ser afetados com as deleções de gene HBA são os valores de HCM, CHCM, VCM, reticulócitos e redução da HbA2 (143–145).

A alfa talassemia tem prevalência mais elevada no continente asiático e africano. De todas as desordens globinicas, é a que mais sofreu expansão geográfica e apresenta maior interação com outras variantes das hemoglobinopatias (1,145).

Para indivíduos heterozigotos, a deleção da cadeia  $\alpha$  globina produz excesso relativo de cadeia  $\gamma$  ou  $\beta$ . As cadeias  $\beta$ -globina em excesso formam tetrâmeros instáveis que se precipitam dentro da célula (146). A interação entre os alelos da alfa talassemia e da beta talassemia diminui o grau de desequilíbrio entre as cadeias (81,143). Com a redução da disponibilidade de cadeias de  $\alpha$ -globina para incorporação nas moléculas, há uma propensão em diminuir a polimerização intra-eritrocitária da HbS, o que leva à redução da rigidez das hemácias e maior tempo de vida dessas células. (147–149). Os parâmetros clínicos e hematológicos são modificados. Contribui na redução do risco de complicações em decorrência da taxa hemolítica e os pacientes tendem a apresentar um fenótipo clínico mais brando (3,65,150). Entretanto pode aumentar o risco de complicações associadas ao aumento da viscosidade (151).

Alguns estudos que mensuraram a interação entre a S $\beta$ -Tal e a alfa talassemia observaram a redução das células densas e falcêmicas, agindo como efeito protetor em algumas manifestações clínicas, como na crise torácica aguda e na redução do risco de acidente vascular cerebral (152–154). Entretanto, tem havido alguns resultados conflitantes na literatura. Outros estudos não demonstraram associação significativa da coexistência da alfa talassemia com eventos fisiopatológicos e variáveis hematológicas, embora alguns deles tenham um número limitado de pacientes com S $\beta$ -Tal (65,68,155).

Ao contrário dos efeitos das deleções, a triplicação da  $\alpha$  globina pode exacerbar o desequilíbrio entre as cadeias e desempenhar um papel importante na fisiopatologia da doença (139,156,157). A triplicação resulta em cadeias livres de globinas  $\alpha$  que precipitam, formam corpos de inclusão e levam à destruição da membrana celular (139,158). O sistema retículo endotelial é responsável pela retirada dos corpos de inclusão pelos macrófagos, conseqüentemente a formação de micrócitos devido a lesões nos eritrócitos (158). Em um estudo na Índia, os pacientes com triplicação apresentaram fenótipo clínico mais grave, bem como menores níveis de Hb e persistência de esplenomegalia (159).

### 3 OBJETIVOS

Estimar a incidência e descrever a história natural de crianças com S $\beta$ -tal triadas pelo Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD) da Faculdade de Medicina da UFMG, por meio do Programa de Triagem Neonatal de MG (PTN-MG) e acompanhadas no Hemocentro de Belo Horizonte (HBH) da Fundação Hemominas.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Identificar e determinar a frequência genotípica das alterações moleculares causadoras de  $\beta$ -Tal na casuística estudada (crianças S $\beta^+$ -Tal e S $\beta^0$ -Tal).
- Identificar e determinar a frequência deletional de Alfa Talassemia e triplicação de genes HBA na casuística estudada.
- Verificar se há associação da co-herança da alfa-talassemia com parâmetros hematológicos e clínicos.
- Estimar a incidência dos fenótipos S $\beta^+$ -Tal e S $\beta^0$ -Tal no estado de Minas Gerais.
- Determinar os haplótipos do agrupamento de genes da beta globina na casuística estudada.
- Determinar o nível basal de parâmetros hematológicos (HbA, HbS, Hb total, HbF, HbA<sub>2</sub>, reticulócitos, leucócitos, plaquetas, VCM e HC) na casuística estudada.
- Determinar a frequência de manifestações clínicas (AVC, CVO, infecção, SEA, STA e transfusão) associadas à doença falciforme na casuística estudada.
- Identificar o risco de acidente vascular cerebral pelo Doppler transcraniano.
- Verificar se há associação de características genéticas (mutações causadoras de  $\beta$ -Tal e haplótipos do agrupamento de genes da beta globina) com parâmetros clínicos e hematológicos.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Delineamento e local de estudo

Tratou-se de um estudo do tipo coorte retrospectiva realizado com crianças com doença falciforme, subtipo S $\beta$ -talassemia, triadas pelo PTN-MG e acompanhadas na Fundação Hemominas.

#### 4.1.1 Casuística

Para o estudo de História Natural, a casuística constou de crianças nascidas entre janeiro de 1999 a dezembro de 2015, triadas pelo PTN-MG e acompanhadas no ambulatório do Hemocentro de Belo Horizonte (HBH) da Fundação Hemominas. Para estudo da incidência de S $\beta^0$ -Tal e S $\beta^+$ -Tal no estado de Minas Gérias, foram incluídas todas as crianças triadas pelo NUPAD no Estado entre janeiro de 2011 e dezembro de 2015 (5 anos) com perfil proteico sugestivo de S $\beta$ -Tal [*Isoelectricfocusing* (IEF) e/ou HPLC, e PCR alelo-específica para o códon 7 de *HBB*, disponível para todas as crianças a partir de fevereiro/março de 2010]. Parte da identificação das mutações do alelo beta talassêmico em crianças S $\beta^0$ -Tal e S $\beta^+$ -Tal foi realizada previamente em outro estudo (160).

Todas as informações clínicas utilizadas foram retiradas dos prontuários médicos dos pacientes atendidos no ambulatório da Fundação Hemominas e os dados foram armazenados em um banco de dados no programa *Access* (Microsoft). O período do acompanhamento clínico da população de estudo situou-se entre 01/01/1999 (início do acompanhamento da coorte) e 01/01/2019 (término do acompanhamento da coorte), de modo que todas as crianças foram acompanhadas por, no mínimo, três anos.

#### 4.1.2 Critérios de Inclusão

- Crianças nascidas entre janeiro de 1999 e dezembro de 2015 triadas pelo PTN-MG com doença falciforme subtipo S $\beta$ -Tal e acompanhadas no Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas.
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos responsáveis e o Termo de Assentimento quando necessário.
- Para cálculo da incidência de S $\beta^0$ -Tal e S $\beta^+$ -Tal no estado de Minas Gerais, foram incluídas todas as crianças nascidas entre janeiro de 2011 e dezembro de 2015 triadas pelo NUPAD com doença falciforme subtipo S $\beta$ -Tal, conforme definição anterior.

#### 4.1.3 Critérios de Exclusão

- Crianças com perfil hemoglobínico compatível com outros subtipos de doença falciforme (SS, SC, SD e outros);
- Crianças nas quais o resultado do sequenciamento foi compatível com outras hemoglobinas variantes, cuja mobilidade proteica assemelhava-se à da Hb A e cuja PCR alelo-específica também mostrava GAG e GTG no códon 7 de *HBB*.
- Crianças que evoluíram para o óbito antes do início do estudo;
- Crianças encaminhadas ao HBH que compareceram à primeira consulta e não deram seguimento ao acompanhamento clínico por qualquer razão;
- Crianças que obtiveram alta do programa de acompanhamento clínico por qualquer razão;
- Crianças transferidas para acompanhamento em outro hemocentro.

- Crianças que não puderam ser encontradas durante a realização do estudo para serem esclarecidas e convidadas a participar.
- Crianças e/ou responsáveis que não aceitaram participar do estudo.

A figura 10 ilustra o fluxograma de pacientes, conforme os critérios de inclusão e exclusão abaixo explicitados.

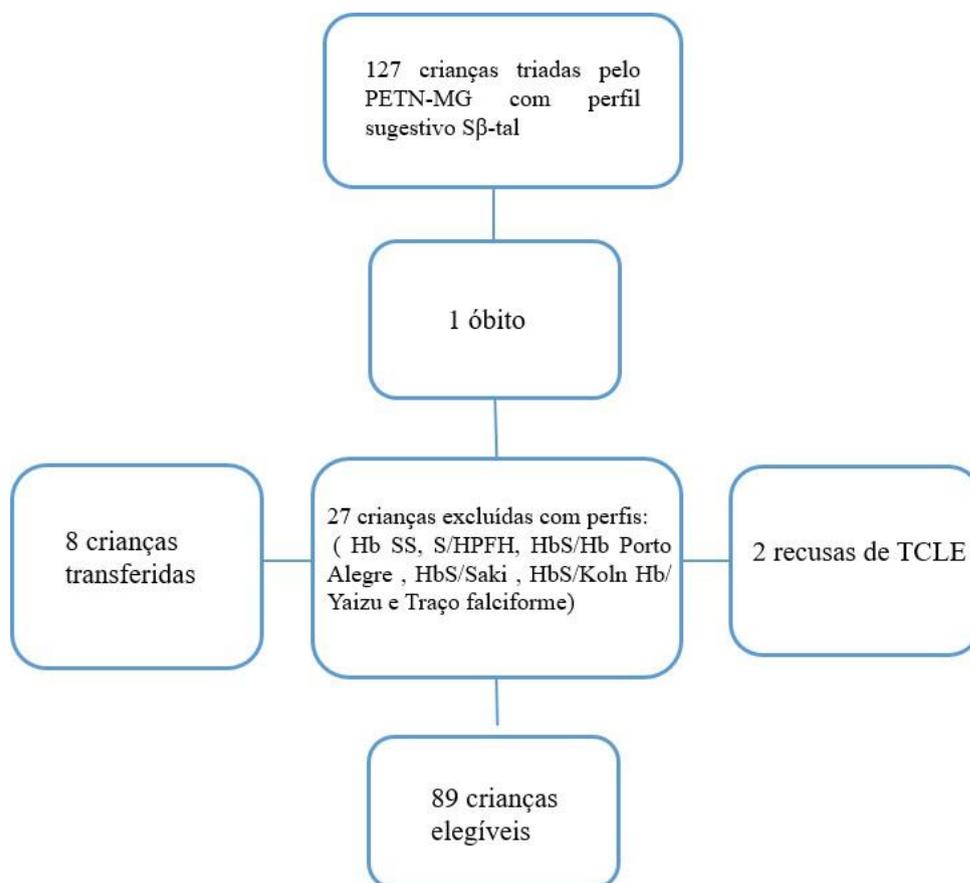


Figura 9 - Fluxograma de seleção amostral com base nos critérios de inclusão e exclusão

## 4.2 Aspectos éticos

A execução do estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas (CEP Hemominas) (CAAE: 56282216.0.0000.5118) (anexo 1) e pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP) (CAAE: 56282216.0.3001.5149).

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 2) e o Termo de Assentimento (TA) (anexo 3) foram apresentados aos responsáveis e aos participantes do estudo, quando aplicável. Para conceder a autorização para participação, o responsável legal e, quando necessário, as próprias crianças assinaram o termo, ficando sob sua guarda uma cópia e outra cópia sob a guarda dos pesquisadores. Para garantir o sigilo das informações, os dados dos prontuários foram acessados exclusivamente pelos pesquisadores com autorização prévia do CEP da Fundação Hemominas.

## 4.3 Variáveis hematológicas

As variáveis hematológicas analisadas foram:

- Concentração total de hemoglobina (Hb, g/dL),
- Volume corpuscular médio (VCM, fL),
- Hemoglobina corpuscular média (HCM, pg),
- Leucometria total (LEU,  $10^9/L$ ),
- Plaquetometria (PLAQ,  $10^9/L$ ),
- Concentração relativa de hemoglobina fetal (Hb F, %),
- Contagem de reticulócitos (Retic, %).

Os valores de Hb total, VCM, HCM, LEU e PLAQ foram obtidos utilizando-se o contador eletrônico de células (Coulter T890, Coulter, Hialeah, FL, EUA ou CELL-DYN Ruby, Abbott Laboratories, Santa Clara, CA, USA). A quantificação das frações de hemoglobinas foi feita por eletroforese de Hb em pH alcalino, em pequena proporção nos casos mais antigos ou, mais frequentemente, por cromatografia líquida de alta eficiência (high performance liquid chromatography - HPLC), usando o kit Beta-thalassaemia Short Program no analisador Variant II (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Para a contagem de reticulócitos, usou-se o método de azul

de cresil brilhante na microscopia óptica ou os resultados proporcionados pelo contador eletrônico de células. Todas as informações contidas nos prontuários foram armazenadas no programa Microsoft Access®.

Para determinação do nível basal de cada paciente, foi considerada a média de todos os valores de exames após os dois anos de idade, desprezando-se os valores após transfusões sanguíneas (90 dias). Os valores foram considerados até a data anterior do início do regime de transfusão crônica ou o início do tratamento com a HU.

Os níveis basais de LEU, VCM, HCM, HbF, Retic e contagem de plaquetas, foram determinadas pelas médias dos valores de todos os exames válidos.

#### **4.4 Variáveis genéticas**

##### **4.4.1 Extração e quantificação do DNA genômico**

As amostras foram colhidas e centrifugadas a 2.000 x g em centrífuga (Z323K, Hermle, Wehingen, Germany) durante 10 minutos para a separação do sangue total e obtenção do *buffy-coat* para a extração de DNA. A extração do DNA genômico foi realizada com o uso do kit comercial (QIAamp® DNA Blood Mini Kit, QIAGEN) de acordo com instruções do fabricante. Para leitura da concentração e do grau de pureza do DNA, a amostra foi colocada no espectrofotômetro (NanoVueplus, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), calibrado anteriormente com água deionizada. A concentração do DNA em ng/μL e a relação do grau de pureza (absorvância em 260 nm dividido pela absorvância em 280 nm) foram documentados para posterior diluição em 50 ng/μL.

##### **4.4.2 Sequenciamento para identificação mutações da Beta Talassemia**

###### **4.4.2.1 Amplificação do fragmento 1 do gene *HBB***

A amplificação do fragmento 1 do gene *HBB* foi realizada por meio da reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou reação em Cadeia da Polimerase) utilizando 250 ng de DNA com volume final de 50 μL, com tampão de 1X 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de dNTPs, 1 U de Taq Platinum ® e 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético no sentido direto e

reverso, como demonstrado na tabela 4. A reação de PCR foi realizada no termociclador (Veriti, AppliedBiosystems; Foster City, CA, USA) com etapa inicial de 96

° C por 4 minutos, 40 ciclos de 96° C por 30 segundos, 65° C por 30 segundos, 72° C por um minuto e extensão final de 70° C por 5 minutos.

#### 4.4.2.2 Amplificação do fragmento 2 do gene *HBB*

Amplificação do fragmento 2 do gene *HBB* foi realizada por meio da reação de PCR utilizando 250 ng de DNA com volume final de 50  $\mu$ L, com tampão de 1X 2 mM de  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M de dNTPs, 1 U de Taq Platinum® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético no sentido direto e reverso como demonstrado na tabela 4. A reação de PCR foi realizada no termociclador (Veriti, Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) com etapa inicial de 96° C por 4 minutos, 40 ciclos de 96° C por 30 segundos, 57° C por 30 segundos, 72° C por 1 minuto e extensão final de 72° C por 5 minutos. A figura 11 demonstra a região dos fragmentos 1 e 2 no gene da *HBB*.

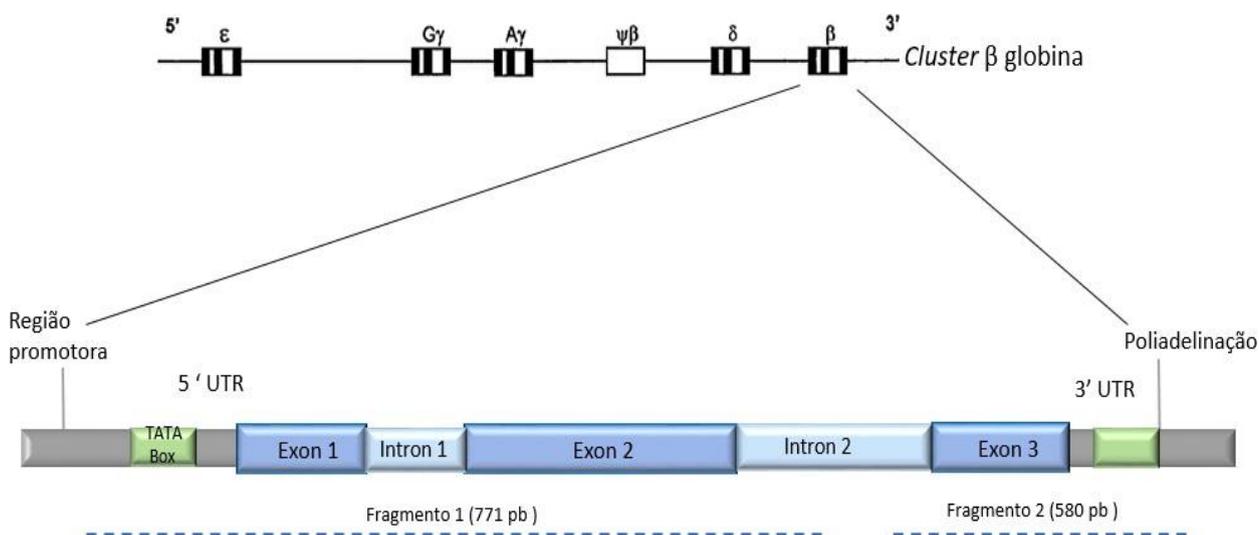


Figura 10 : Representação esquemática do gene da *HBB* e as regiões do fragmento 1 e 2 utilizadas no sequenciamento. Com modificações de BELISÁRIO, 2015 (160).

Tabela 5- Iniciadores (*primers*) utilizados na amplificação do fragmento 1 e fragmento 2 do gene *HBB*.

Região amplificada	Iniciadores	Tamanho do fragmento
Fragmento 1	D: 5' TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG 3'	771 pb
	R: 5' TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG 3'	
Fragmento 2	D: 5' TCATGCCTCTTTGCACCATTC 3'	580 pb
	R: 5' GGAATGTGGGAGGTCAGTGTTTCTTGCCATGAGCCTTC 3'	

Fonte: BELISÁRIO, 2015 (160).

#### 4.4.2.3 Purificação do produto de PCR dos fragmentos 1 e 2 do gene *HBB*

Para a purificação do fragmento 1 e 2, foram utilizados 20  $\mu$ L e 50  $\mu$ L, respectivamente, dos seus produtos de PCR e adicionado o mesmo volume de Peg e pipetou-se por 100 vezes. As amostras foram mantidas em uma incubadora (LabnetVortemp56, Woodbridge City, NJ, USA) em uma temperatura de 40° C por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram transferidas para uma centrífuga (MiniSpin, Eppendorf, Hamburg City, GER). Após 15 minutos na centrífuga, retirou-se o sobrenadante das amostras e aplicaram-se 125  $\mu$ L de etanol (80%) e aguardou-se por 2 minutos. As amostras foram centrifugadas para retirar o etanol e aplicou-se 25  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O previamente aquecida a 60° C e pipetou-se por 50 vezes. Para verificar o rendimento da purificação, 5  $\mu$ L de amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% corado com brometode etídio, 90 volts, por 45 minutos em cuba contendo tampão de TAE1X. O gel foi visualizado em transiluminador (Molecular Imager ®, DocTM, XR imagem LabTMsoftware, BIO-RAD, CA, USA).

#### 4.4.2.4 Reação de sequenciamento

Os procedimentos desta etapa, até a fase de eletroforese capilar, foram realizados por uma empresa terceirizada, utilizando-se o método de Sanger. Cerca de 20 ng foram purificados para cada 100 pb do fragmento alvo e adicionado 1  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo (10 pmoles), 3  $\mu\text{L}$  do tampão de diluição (5X Sequencing Buffer; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 2  $\mu\text{L}$  de BigDye v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e completado o volume final com água para 20  $\mu\text{L}$ . As reações de sequenciamento foram realizadas em um termociclador (Veriti, Applied) com fase inicial de 96° C por 1 minuto, com 35 ciclos de 96° C por 15 segundos, 50° C por 15 segundos e 60° C por 4 minutos. Posteriormente as amostras foram armazenadas a 4° C.

#### 4.4.2.5 Precipitação da reação de sequenciamento

Para a precipitação, foram adicionados no produto de reação de sequenciamento 60  $\mu\text{L}$  de etanol 100%, 27  $\mu\text{L}$  de água tipo 1 e 3  $\mu\text{L}$  de NaAc 3M. O conteúdo foi incubado por 15 minutos em temperatura ambiente e a cada 3 minutos, foi homogeneizado por inversão. Centrifugou-se a 2.000 x g por 30 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  de etanol 70% mantido a -20° C. Posteriormente a placa foi homogeneizada por inversão por 10 vezes, centrifugada por 2.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. A placa foi novamente centrifugada por 50 x g durante 1 minuto. Em cada poço da placa, adicionaram-se 10  $\mu\text{L}$  de formamida (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) e homogeneizou-se por 5 minutos. Finalmente a placa foi submetida a uma temperatura de 96° C por 5 minutos e em seguida foi armazenada no gelo até o início da eletroforese capilar.

#### 4.4.2.6 Eletroforese capilar

A eletroforese capilar foi realizada em aparelho ABI3730 (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA), utilizando-se polímero POP7 (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) e capilar de 36 ou 48 centímetros (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA).

#### 4.4.2.7 Análise dos dados sequenciados

Os dados foram analisados por meio do programa Mega X 10.0.5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, USA), comparando-se com a sequência depositada no GenBank (NG\_000007.3). As mutações foram identificadas com base na lista de mutações em Thein 2013 e pelo Globin Gene Server (<http://globin.bx.psu.edu/hemoglobinvar>).

#### 4.4.3 Genotipagem dos haplótipos do agrupamento de genes da $\beta^S$ -globina

A identificação dos haplótipos do agrupamento de genes da  $\beta^S$ -globina, foi realizada por meio de técnicas de PCR e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição), conforme SUTTON *et al* (119), em cinco sítios polimórficos  $A\gamma$ ,  $G\gamma$ ,  $\psi\beta$ ,  $3'\psi\beta$  e  $5'\beta$ . As condições das técnicas de PCR e RFLP para os cinco sítios estão descritas na tabela 6.

A amplificação dos fragmentos para identificação dos haplótipos  $\beta^S$ -globina foi realizada por meio da reação de PCR utilizando 100 ng de DNA, com volume final da reação de 20  $\mu$ L, contendo 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M de dNTPs, 10 pmoles de cada oligonucleotídeos sintéticos no sentido direto e reverso como demonstrado na tabela 4, e 0,8 U de TaqPlatinum® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A reação de PCR foi realizada no termociclador (Veriti, Applied Biosystems; Foster City, CA, USA ou T100 ThermalCycler, Bio-Rad). Para as regiões  $A\gamma$ ,  $G\gamma$ ,  $\psi\beta$  e  $5'\beta$  as condições de amplificação foram de 94°C por 5 min, 94 °C por 45 segundos, 57° C por 30 segundos ;72° C por 45 segundos com 35 ciclos e extensão final de 72° C por 10 minutos. Para a região  $3'\psi\beta$  as condições de amplificação foram de 94° C por 5 minutos; 94 °C por 45 segundos; 60° C por 30 segundos ;72° C por 45 segundos com 35 ciclos e extensão final de 72° C por 10 minutos.

Tabela 6 - Condições para determinação dos haplótipos  $\beta^S/\beta$ -Tal.

Região amplificada	Condições PCR	Oligonucleotídeos	Endonuclease sequenciamento	ou Fragmento de restrição ou sequenciamento
$\epsilon$	95°C/5min; (95°C/45seg; 52°C/45seg;72°C/45s eg x 35 ciclos); 72°C/10min	D 5' TCTCTGTTTGATGACAAAATTC3' R 5' AGTCATTGGTCAAGGCTGACC3'	Sequenciamento	AC/AC (-/-) AAC/AC (+/-) AAC/AAC (+/+)
$G\gamma$	94°C/5min(94°C/45s eg;57°C/30seg;72°C/ 45seg x 35 ciclos) 72°C/10 min	D 5'TGCTGCTAATGCTTCATTACAA3' R 5' AAGTGTGGAAGTGTGCACATGA3'	HindIII 5'...A↓AGCTT...3	781pb -/- 781pb+436pb+345pb+/- 436pb+345pb +/+
$A\gamma$	94°C/5min(94°C/45s eg;57°C/30seg;72°C/ 45seg x 35 ciclos) 72°C/10 min	D 5'TGCTGCTAATGCTTCATTACAA3' R 5' TAAATGAGGAGCATGCACACAC3'	HindIII 5'...A↓AGCTT...3	766 -/- 766pb +406pb+360pb +/- 406pb+360pb +/+
$\Psi\beta$	94°C/5min(94°C/45s eg;57°C/30seg;72°C/ 45seg x 35 ciclos) 72°C/10 min	D 5'GAACAGAAGTTGAGATAGAGA 3' R 5' ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT 3'	HincII 5'...GTY↓RAC...3'	701pb -/- 701 pb, 361 pb e 340 pb +/- 361 pb e 340 pb +/+
$3'\Psi\beta$	94°C/5min;(94°C/45s eg;60°C/30seg;72°C/ 45seg x 35 ciclos); 72°C/10min	D 5' TCTGCATTTGACTCTGTTAGC 3' R 5'GGACCCTAACTGATATAACTA 3'	HincII 5'...GTY↓RAC...3'	592 pb -/- 517+97 pb+/- 97 pb+/-
$5'\beta$	94°C/5min(94°C/45s eg;57°C/30seg;72°C/ 45seg x 35 ciclos) 72°C/10 min	D 5' CTACGCTGACCTCATAAATG 3' R 5' CTAATCTGCAAGAGTGTCT 3'	Hinfl 5'...G↓ANTC...3'	383 pb -/- 383pb+241pb+142pb +/- 241pb+142pb +/+
$\beta$	94°C/4min (96°C/30seg;64°C/30 seg;72°C/1mimx40 ciclos)72°C/5 min.	D 5'TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG 3' R 5'TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG 3'	Sequenciamento	CC(+/+) CG(+/-)
$3'\beta$	95°C/5min;n(95°C/45 seg;50°C/45seg;72°C /45seg x 35 ciclos) 72°C/10 min	D 5' TGGATTCTGCCTAATAAAA3' R 5'GGGCCTATGACAGGGTAAT3'	Hinfl 5'...G↓ANTC...3'	341, 245 , 154 -/- 341, 245, 213, 154 e 128 +/- 245, 213, 154 e 128 +/+

Fonte: SUTTON, 1989 (119).

Para a análise dos sítios polimórficos, os produtos amplificados por PCR (10  $\mu$ L) foram digeridos por endonuclease adequadas para cada sítio, com volume final de 20  $\mu$ L. Para a região IVS-II dos genes  $G_y$  e  $A_y$ , foi utilizado a enzima Hind III, para  $\psi\beta$  e  $3'\psi\beta$ , a Hinc II, e para a extremidade 5' de  $\beta$ , a enzima HinfI. O tempo de incubação foi de 1 hora a 37° C, exceto para  $\psi\beta$  e  $3'\psi\beta$ , com 3 horas de incubação. Finalmente, a enzima foi inativada com a temperatura de 65° C por 20 minutos (tabela 6).

Para visualização dos fragmentos de restrição, o produto foi aplicado em gel de agarose a 3% com brometo de etídio (10  $\mu$ g/mL). A eletroforese foi feita durante 90 minutos por 80 volts e tampão TAE 1x. O gel foi visualizado em transiluminador (Molecular Imager®, DocTM, XR imagem LabTM software, BIO-RAD, CA, USA).

#### 4.4.4 Genotipagem dos haplótipos do alelo $\beta$ -Tal

Além dos cinco sítios polimórficos ( $A_y$ ,  $G_y$ ,  $\psi\beta$ ,  $3'\psi\beta$  e  $5'\beta$ ) descritos na seção "Genotipagem dos haplótipos do agrupamento de genes da  $\beta^S$ -globina", foram analisados mais três sítios polimórficos,  $\epsilon$ ,  $\beta$  e  $3'\beta$ , para a identificação dos haplótipos  $\beta$ -Tal.

O sítio  $\epsilon$  (rs3834466) foi determinado por sequenciamento. A amplificação do fragmento do gene *HBE* foi realizada por meio da reação de PCR utilizando 50 ng de DNA, tampão 1X, 2 mM de  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M de dNTPs, 0,8 U de Taq Platinum® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético no sentido direto 5' TCTCTGTTTGATGACAAATTC 3' e reverso: 5'-AGTCATTGGTCAAGGCTGACC-3' para um volume final de 20  $\mu$ L. A reação de PCR foi realizada no termociclador (Veriti, Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) com etapa inicial de 95° C por 5 minutos, 35 ciclos de 95° C por 45 segundos, 52° C por 45 segundos, 72° C por 45 segundos e extensão final a 72° C por 10 minutos.

O sítio  $\beta$  (AvaII) foi determinado por sequenciamento. A amplificação do fragmento foi realizado através da reação de PCR utilizando 50 ng de DNA, tampão 1X, 2mM de  $MgCl_2$ , 200 $\mu$ M de dNTPs, 0,8 U de Taq Platinum® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 10 pmoles de cada oligonucleotídeos sintéticos no sentido direto 5'-TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG 3' e reverso 5' TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG 3'

para volume final de 20µl. A reação de PCR foi realizada no termociclador (Veriti, AppliedBiosystems; Foster City, CA, USA) com etapa inicial 94°C/4min; 40 ciclos de 96°C/30seg; 64°C/30seg;72°C/1min e extensão final de 72°C/ 5 min. Os protocolos de purificação e sequenciamento foram descritos da seção

4.5.2.3 à seção 4.5.2.7.

O sítio 3'β foi determinado por PCR e RFLP. A amplificação foi realizada por meio da reação de PCR utilizando 50 ng de DNA, com tampão 1X, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de dNTPs, 0,8 U de Taq Platinum ® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético no sentido direto 5'-TGGATTCTGCCTAATAAAA-3' e reverso: 5'-GGGCCTATGACAGGGTAA-3' e reverso, como demonstrado na tabela 4 para um volume final de 20 µL. O produto amplificado foi submetido a técnica de restrição, utilizando a endonuclease HinfI, com volume final de 20 µL em uma temperatura de 37° C e posteriormente inativada a 65° C por 20 minutos.

Para visualização dos fragmentos de restrição, o produto foi aplicado em gel de agarose de 3% com brometo de etídio (10µg/mL). A eletroforese foi feita durante 90 minutos a 80 volts e tampão TAE 1x. O gel foi visualizado em transiluminador (MolecularImager ®, DocTM, XR imagem LabTMsoftware , BIO-RAD, CA, USA).

#### 4.4.5 Diagnóstico da deleção Corfu

Para a identificação da deleção Corfu associada à mutação IVS-I-5 G>A foi realizado o teste de MLPA (Amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação). O procedimento foi realizado na Universidade estadual de Campinas – UNICAMP com protocolo fornecido pela instituição.

O DNA foi dissolvido em uma solução de TE (10mM Tris-HCl pH 8,2 + 0,1mM EDTA), com concentração final de 10ng/µ e volume final de 5,0µl.

##### 4.4.5.1 Reação de MLPA

A reação de MLPA ocorreu com etapa inicial de desnaturação 98° C por 5 minutos, pausa a 25° C. Adicionou-se 1,5 µL de SALSA MLPA Buffer e 1,5 µL de MLPAProbemix por

amostra desnaturada. A hibridização ocorreu a 95 ° C por 1 minuto e pausada 16-20 horas a 60 ° C. A reação de ligação seguiu a etapa inicial de pausa a 54° C, adicionando-se o mix de 25 µL água, 3,0 µL do MLPA Buffer Ligase A, 3,0 µL do MLPABuffer Ligase B e 1,0 µL da Enzima Ligase 65 com volume de 32 µL para cada amostra. As próximas etapas de hibridização foram de 54°C por 15 minutos, 98°C por 5 minutos e etapa final de 20°C para armazenamento das amostras. Para a etapa de PCR preparou-se omix de 7,5 µL de água, 2,0 µL do SALSA PCR Primer mix (Ambar) e 0,5 µL do SALSA Polimerase por cada 10 µL de amostra seguindo as etapas 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto com repetições de 35 ciclos. As amostras foram preparadas para a reação de sequenciamento adicionando-se o mix 0,2 µL do LIZ *size standard* e 9,0 µL de Formamida por 0,7 µL amostra. As amostras foram desnaturadas a 86°C por 10 minutos e posteriormente realizada a eletroforese capilar.

#### 4.4.6 Diagnóstico Molecular da Talassemia Alfa

Para a identificação das deleções e triplicação dos genes *HBA*, padronizou-se a reação multiplex gap-PCR, conforme De Mare (139), utilizando 250 ng de material genômico e kit comercial (QIAGEN ® Multiplex PCR kit, QIAGEN). Para o preparo com volume final de 15 µL do mix, foram utilizados oligonucleotídeos sintéticos em concentrações distintas, descritas na tabela 6. As condições da ciclagem foram de 96° C por 15 minutos; 30 ciclos de 98° C por 45 segundos; 62° C por 90 segundos; 72° C por 150segundo e extensão final a 72° C, por 5 minutos. A reação de PCR foi realizada no termociclador (Veriti, Applied Biosystems; Foster City, CA, USA). Para visualização dos fragmentos, o produto foi aplicado em gel de agarose de 1% com brometo de etídio (10µg/mL). A eletroforese foi feita durante 120 minutos a 90 volts e tampão TAE 1x. O gel foi visualizado em transiluminador (Molecular Imager ®, DocTM, XR imagem LabTMsoftware. BIO-RAD, CA, USA). Para visualização dos produtos de PCR, as amostras foram adicionadas no gel de agarose a 1% com tampão de corrida e contendo brometo de etídio (10 µg/mL). A corrida de eletroforese foi realizada por 120 minutos a 90volts em cuba contendo tampão TAE 1x. O gel foi visualizado em transiluminador(Molecular Imager ®, DocTM, XR imagem LabTMsoftware , BIO-RAD, CA, USA). A determinação do genótipo foi realizado por meio da verificação do tamanho do fragmento de acordo com o padrão de corrida de 250 pb DNA Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

A figura 11 expõe uma visão esquemática das posições relativas dos *primers* com as sete deleções mais comuns e a triplicação. As condições das técnicas de PCR estão descritas na tabela 7.

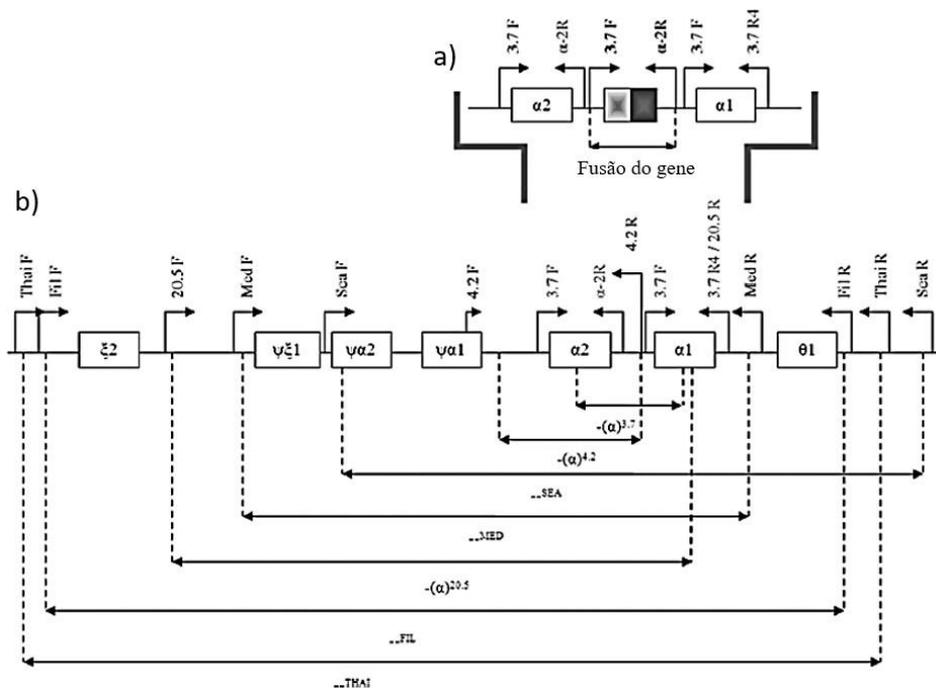


Figura 11- Representação esquemática do *cluster* da  $\alpha$  globina e a localização dos *primers*. a) representação do processo de fusão do gene e a triplicação  $aaa$  -3.7. b) Representação das sete principais deleções. Adaptado de MARE, 2010 (139).

Tabela 7 - Sequência de oligonucléotídeos sintéticos para as deleções e triplicação da  $\alpha$ -Tal com as concentrações e o tamanho do fragmento esperado.

Região da deleção	Sequência 5'-3'	Concentração	Tamanho do fragmento
3.7-F	AAGTCCACCCCT TCCTTCCTCACC	0.4 $\mu$ M	1794 bp ( $a_2$ ), 2462 bp ( $a_1$ ), 2212 bp ( $-a_{3.7}$ ), 2044 bp ( $aaaanti$ 3.7)
$a_2$ -R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	0.2 $\mu$ M	1800 pb

3.7-R4	TGACCTACCCACCACCCATA	0.6 $\mu$ M	2462 bp ( <i>a</i> 1), 1 256 bp [ $-(a)20.5$ ]
20.5-F	GCCCAACATCCGGAGTACATG	0.3 $\mu$ M	1007 pb
4.2-F	GGTTTACCCATGTGGTGCCTC	0.5 $\mu$ M	
4.2-R	CCCGTTGGATCTTCTCATTTCCC	0.5 $\mu$ M	1628 pb
MED-F	TACCCTTTGCAAGCACACGTAC	0.2 $\mu$ M	
MED-R	TCAATCTCCGACAGCTCCGAC	0.2 $\mu$ M	807 pb
SEA-F	CGATCTGGGCTCTGTGTTCTC	0.2 $\mu$ M	
SEA-R	AGCCCACGTTGTGTTTCATGGC	0.2 $\mu$ M	1349 pb
FIL-F	TTTAAATGGGCAAAACAGGCCA GG	1.0 $\mu$ M	
FIL-R	ATAACCTTTATCTGCCACATGTA GC	1.0 $\mu$ M	546 pb
THAI-F	GACCATTCCCTCAGCGTGGGTG	0.3 $\mu$ M	
THAI-R	CAAGTGGGCTGAGCCCTTGAG	0.3 $\mu$ M	1153 pb

Fonte: De Mare, 2010 (139)

#### 4.5 Variáveis clínicas

As variáveis clínicas foram extraídas dos prontuários médicos arquivados do ambulatório da Fundação Hemominas. As crianças foram submetidas a avaliações clínicas com periodicidade variável. Somente os dados clínicos registrados antes do início de tratamento da hidroxiureia ou do período de transfusão “crônica” foram considerados na análise estatística.

A crise vaso-oclusiva foi definida como eventos agudos de dor nas extremidades inferiores e superiores, no abdômen, costas e peito, registrados nos prontuários.

A síndrome torácica aguda (STA) foi definida como dificuldade respiratória acompanhada por um infiltrado pulmonar e febre, exigindo hospitalização.

O sequestro esplênico agudo (SEA) foi definido pela queda de Hb, aumento significativo do baço e resposta compensatória da medula óssea, representada por elevação da contagem de reticulócitos. Esse dado nem sempre estava registrado nos prontuários; com isso, bastava as duas condições acima mencionadas.

O risco de AVC foi avaliado pelo exame de Doppler transcraniano, com crianças elegíveis para o exame, maiores de dois anos. Todas essas variáveis foram definidas e acompanhadas pelo médico hematologista responsável.

O período das transfusões e o uso de da hidroxiureia foram retiradas do prontuário médico.

Para determinação do risco de doenças cerebrovasculares foi utilizado o DTC. O DTC é oferecido a todas crianças acompanhadas na Fundação Hemominas a partir dos dois anos de idade. A determinação do risco e a estratificação foi classificada de acordo com o estudo *“Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia”* (STOP) (161) (Tabela 8).

Tabela 8- Estratificação Doppler transcraniano .

Resultado	Risco	Velocidade do fluxo sanguíneo cerebral
Doppler Normal	baixo	< 170 cm/s
Doppler Condicional baixo ou intermediário	aumento de risco	170-184 cm/s
Doppler Condicional Alto	aumento de risco	185-199 cm/s
Doppler Anormal	risco alto	≥ 200 cm/s
Doppler inadequado	risco indefinido	ausência de insonação

Fonte: *“Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia”* (STOP) (161)

#### 4.5.1 Banco de dados e análise estatística

Todas as informações (dados pessoais, estudo familiar, dados laboratoriais e clínicos) foram consultadas nos prontuários médicos arquivados no ambulatório do Hemocentro de Belo Horizonte e lançadas no programa *Access* (Microsoft®).

Os dados armazenados no banco de dados foram analisados pelo programa *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows* (Versão 20.0.0) para cada variável analisada.

Os resultados de prevalências foram expressos pelo limite de confiança de 95%. Consideraram-se significativos os testes com probabilidade  $p \leq 0,05$ . Os dados quantitativos foram expressos com média  $\pm 1$  desvio padrão (DP), ou pela mediana.

As incidências dos eventos clínicos foram expressas pela taxa de 100 paciente-ano e limite de confiança de 95%. As comparações entre as crianças em relação aos eventos clínicos e as mutações foram feitas por meio do teste exato de Fisher.

Para o evento de sequestro esplênico agudo, foi utilizado o modelo de Kaplan-Meier para a probabilidade de ocorrência do primeiro SEA. Levou-se em consideração o tempo de exposição de cada criança para construção das curvas de sobrevida do modelo Kaplan-Meier.

As associações da co-herança de alfa talassemia com os dados hematológicos foram realizadas com o teste t.

De acordo com a média do percentual de HbA e a gravidade clínica, as mutações encontradas na presente casuística foram distribuídas em quatro grupos distintos. Um grupo para as mutações  $S\beta^0$ -Tal e três grupos para  $S\beta^+$ -Tal (leve, moderado e grave).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização da amostragem para seguimento clínico e laboratorial

O estudo foi composto por 89 participantes, em 85 famílias. Dentre eles 47 (52,8 %) do sexo feminino e 42 (47,2%) do sexo masculino (gráfico 1). A média de idade foi de  $12,3 \pm 5,04$  anos.

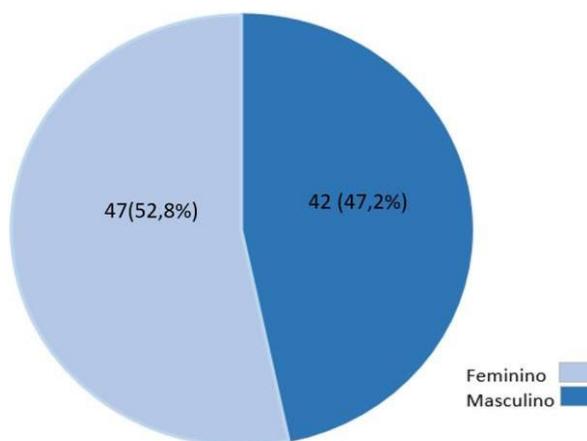


Gráfico 1 – Caracterização amostral por sexo.

### 5.2 Incidência geral no Estado de Minas Gerais

Para o estudo de incidência, o número de recém-nascidos triados pelo PTN- MG no período de cinco anos (2011-2015) foi de 1.179.389 e dentre eles, 53 foram diagnosticados como S $\beta$ -Tal, dos quais 29 (54,7%) identificados como S $\beta^0$ -Tal e 24 (45,3%) como S $\beta^+$ -Tal. Nesse período foram diagnosticadas três crianças com a mutação IVS-I-5 G>A. Para a finalidade de incidência, essas crianças foram consideradas S $\beta^0$ -Tal, pois nenhuma possuía Hb A residual (ver adiante).

A incidência global encontrada no estado de Minas Gerais para S $\beta$ -Tal foi de 1:22.250 (IC a 95%, 1:17.530 a 1:30.450). A incidência de S $\beta^0$ -Tal foi de 1:40.700 (IC a 95%, 1:29.810 a 1:63.940) e a de S $\beta^+$ -Tal, 1:49.140 (IC a 95%, 1:35.100 a 1:81.910), quase

meio a meio, portanto. Os 53 casos de S $\beta$ -Tal representam cerca de 6% do total de crianças com doença falciforme de todos os subtipos (incidência de 1:1.400) (9), diagnosticadas em 5 anos pelo Programa de Triagem Neonatal em Minas Gerais.

### 5.3 Análises moleculares

Os exames genéticos para a identificação das mutações da beta talassemia foram realizados para as 89 crianças. Dentre elas, 88 realizaram os exames genético para alfa talassemia e haplótipos; em uma, a qualidade do material genômico foi inadequado ou insuficiente para esses dois testes. Para as análises do estudo, foram considerados os resultados para as 86 crianças com a identificação da mutação da beta talassemia (ver adiante).

#### 5.3.1 Sequenciamento para identificação mutações da Talassemia Beta

Entre os pacientes incluídos inicialmente no presente estudo pelo padrão de hemoglobina ao nascimento, 13 apresentaram resultados não condizentes com S $\beta$ -Tal. Entre eles, sete (6,86%) eram Hb S/Hb Porto Alegre (HBB:c. 29C>G), dois (1,96%) possuíam traço falciforme, um (0,98%) tinha HbSS (transfundida ao nascimento), (HBB:c.20A>T), um (0,98%) possuía Hb S/Hb Saki (HBB:c.44T>C), um (0,98%) tinha HbS/Köln (HBB:c.295G>A) e um (0,98%) possuía HbS/Yaizu (HBB:c.238G>A), todos confirmados por sequenciamento.

Foram identificadas 14 mutações: 22 (24,7%) com CD39 C>T; 16 (18,0%) com IVS-I-1 G>A; 10 (11,2%) com IVS-I-6 T>C; 9 (10,1%) com -29 A>G; 8 (9,0%) com IVS-I-110 G>A; 6 (6,7%) com IVS-I-5 G>A; 4 (4,5%) com IVS-II-1 G>A; 3 (3,4%) com IVS-II-839 T>C e IVS-II-844 C>A, em cis; 2 (2,2%) com -88 C>T; 2 (2,2%) com -92 C>T; 2 com (2,2%) IVS-II-849 A>G; e um (1,2%), cada, com -101 C>T, IVS-I-2 T>C e poliadelinação AATAAA>AACAAA (gráfico2). Em dois casos S $\beta$ +Thal, não foi encontrada a mutação.

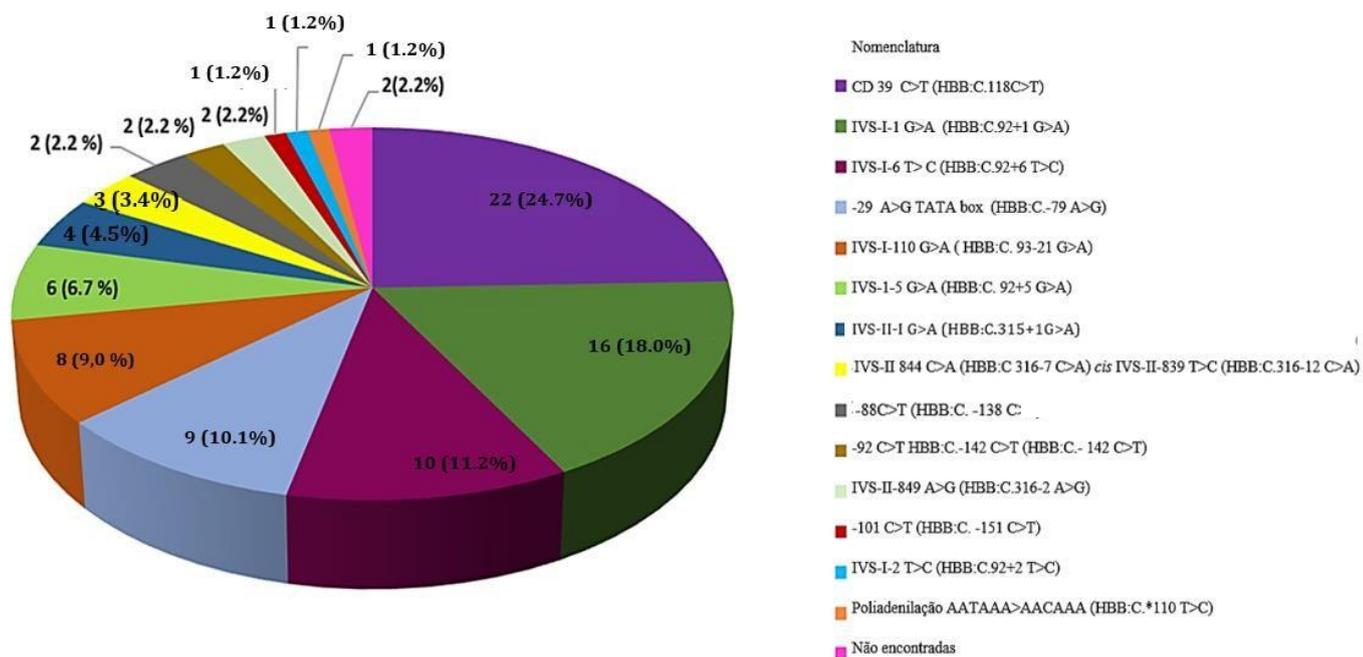


Gráfico 2 – Frequência absoluta e relativa das mutações encontradas.

A figura 12 ilustra o resultado do sequenciamento do *HBB*, evidenciando a mutação CD 39 C>T.

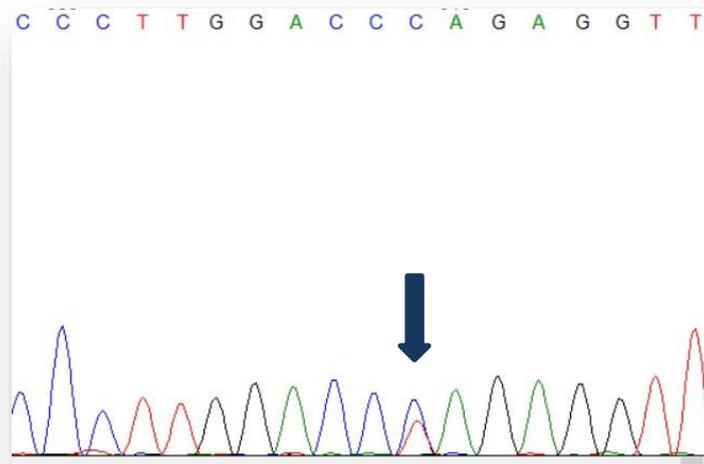


Figura 12– Eletroferograma referente ao sequenciamento do gene *HBB*, mostrando a mutação CD 39 C>T.

### 5.3.2 Identificação dos haplótipos $\beta^S$

Para a determinação dos haplótipos do alelo  $\beta^S$ , foram analisados cinco sítiospolimórficos  $A\gamma$ ,  $G\gamma$ ,  $\psi\beta$ ,  $3'\psi\beta$  e  $5'\beta$ . A figura 13 mostra a fotografia de gel de agarose contendo o resultado da *PCR/RFLP* do fragmento  $A\gamma$ , com *HindII*.

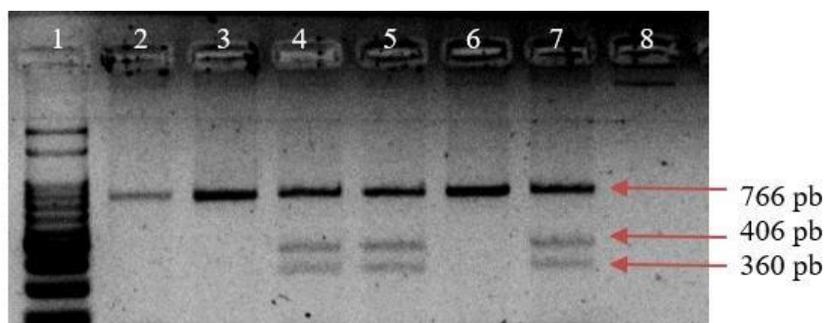


Figura 13 – Genotipagem do fragmento  $A\gamma$ . Gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio contendo produtos de *RFLP* de fragmento  $A\gamma$ . Na primeira canaleta foi aplicado o padrão de peso molecular de 100 pares de base. Nas canaletas 2,3 e 6, amostras (-/-), nas canaletas 4, 5 e 7, amostras (+/-) e canaleta 8 controle negativo.

A figura 14 mostra a fotografia de gel de agarose contendo o resultado da *PCR/RFLP* do fragmento  $G\gamma$ , também com *HindIII*.

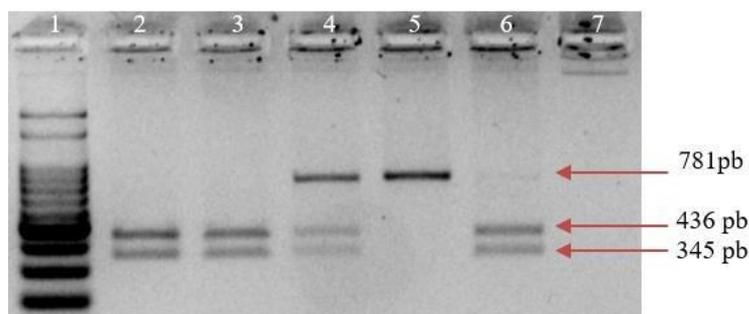


Figura 14 – Genotipagem do fragmento  $G\gamma$ . Gel de agarose 3% corado com brometo de etídio contendo produtos de *RFLP* de fragmento  $G\gamma$ . Na primeira canaleta foi aplicado o padrão de peso molecular de 100 pares de base. Nas canaletas 2,3 e 6 amostras (++), na canaleta 4 amostra (+/-), na canaleta 5 amostra (-/-) e na canaleta 6, controle negativo.

A figura 15 mostra a fotografia de gel de agarose contendo o resultado da *PCR/RFLP* do fragmento  $\psi\beta$ , com *HincII*.

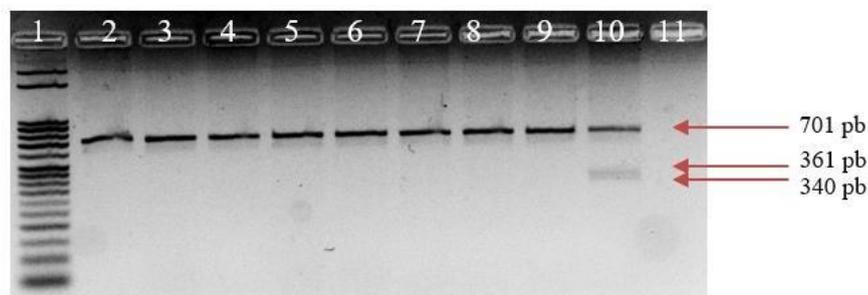


Figura 15 – Genotipagem do fragmento  $\psi\beta$ . Gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio contendo produtos de *RFLP* de fragmento  $\psi\beta$ . Na primeira canaleta foi aplicado o padrão de peso molecular de 50 pares de base. Nas canaletas 2 a 9 amostras (-/-), na canaleta 10 amostra (+/-), na canaleta 11 controle negativo.

A figura 16 mostra a fotografia de gel de agarose contendo o resultado da *PCR/RFLP* do fragmento  $3'\psi\beta$ , também com *HincII*.

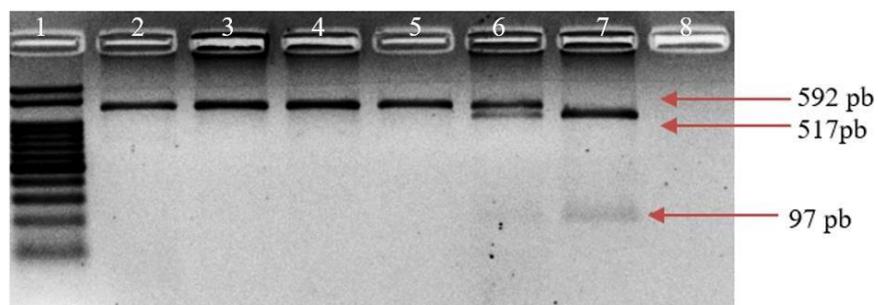


Figura 16– Genotipagem do fragmento  $3'\psi\beta$ . Gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio contendo produtos de *RFLP* de fragmento  $3'\psi\beta$ . Na primeira canaleta foi aplicado o padrão de peso molecular de 50 pares de base. Nas canaletas 2 a 5 amostras (-/-), na canaleta 5 amostra (+/-), na canaleta 6 amostra (+/+) e na canaleta 7 controle negativo.

A figura 17 mostra a fotografia de gel de agarose contendo o resultado da *PCR/RFLP* do fragmento  $5'\beta$ , com *HinfI*.



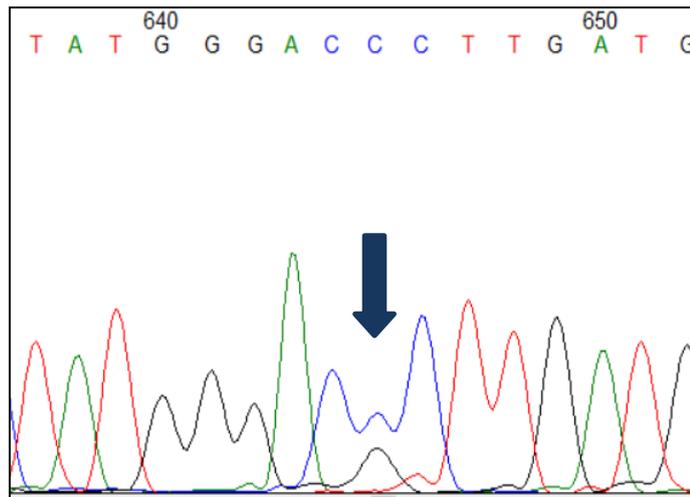


Figura 19 – Eletroferograma referente ao sequenciamento do sítio  $\beta$  (IVS-II-16 G>C), com o polimorfismo rs10768683. O sequenciamento demonstrou o resultado em heterozigose C/G (+/-).

A figura 20 mostra a fotografia de gel de agarose contendo o resultado da *PCR/RFLP* do fragmento 3' $\beta$ , com *HinfI*.

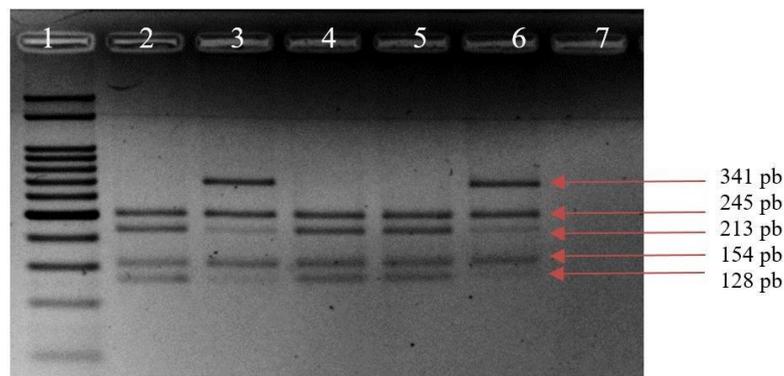


Figura 20 – Genotipagem de 3' de *HBB*. Gel de agarose 3% corado com brometo de etídio contendo produtos de *RFLP* a 3' de *HBB* (polimorfismo rs10837631). Na primeira canaleta foi aplicado o padrão de peso molecular de 100 pares de base. Na canaleta 2,4 e 5 amostras AA (+/+), nas canaletas 3 e 6 amostras AT (+/-) e na canaleta 7, controle negativo.

Para as 86 crianças que foram identificadas as mutações do alelo beta talassêmico e nas quais foi possível realizar a identificação dos haplótipos, a prevalência do haplótipo CAR foi de 50 casos (58,1%), seguido do haplótipo Benin, 25 (29,1%), dois (2,3%) Senegal, e um (1,2%), atípico. Em oito casos (9,3%), não foi possível a classificação como CAR ou Benin.

Quanto aos haplótipos do alelo beta-talassêmico, 12 (13,9 %) foram do tipo I; 13 (15,2%) do tipo II; um (1,2%) tipo IV; 24 (27,9%) do tipo V; três (3,5%) tipo VI; três (3,5%) tipo

VII, seis (6,9%) tipo IX; e 10 (11,6%) foram considerados atípicos (ATP). Em 14 crianças (16,3%), o haplótipo beta-tal não foi determinado porque o sítio *AvaII* não pôde ser sequenciado, por restrições orçamentárias do projeto.

A tabela 9 mostra a descrição dos haplótipos  $\beta^S$  e  $\beta$ -tal, de acordo com o tipo de mutação encontrada no estudo.

Tabela 9 - Descrição dos haplótipos  $\beta^S$  e  $\beta$ -tal em 86 crianças, de acordo com o tipo de mutação

Mutação	Haplótipo $\beta^S/\beta$ -tal
-101 C>T (n=1)	Ben/I (1)
-92 C>T (n=2)	CAR/V (2)
-88 C>T (n=2)	CAR/VII (1) e CAR/ATP (1)
-29 A>G TATA box (n=8) *	Ben/IX (3), Sen/IX (2), Car/IX (1), CAR/I (1), Ben/ATP (1)
IVS-I-I G>A (n=16)	CAR/V (8), Ben/V (6), CAR/I (2)
IVS-I-II T>C (n=1)	CAR/ATP ou Ben/ATP
IVS-I-5 G>A (n=6)	CAR/V (4), Ben/V (1), ATP/V (1)
IVS-I-6 T>C (n=10)#	CAR/VI (2), Ben/VII (2), CAR/IV (1), Ben/VI (1), CAR/? (4)#
IVS-I-110 G>A (n=8)#	CAR/I (5), Ben/I (2), Ben/? (1)
CD 39 C>T (n=22)#	CAR/II (11), Ben/II (2), CAR/? (5)#, Ben/? (4)#
IVS-II-I G>A (n=4)	CAR/V (1), Ben/V (1), CAR/ATP ou Ben/APT (2 irmãos)
IVS-II-839 T>C e IVS-II-844 C>A em <i>cis</i> (n=3)	CAR/ATP ou Ben/ATP (3, de famílias distintas)
IVS-II-849 A>G (n=2)	CAR/ATP ou Ben/ATP (2 irmãs)
Poliadelição (n=1)	CAR/I (1)

\*Não foi possível a genotipagem de ambos haplótipos em um caso#

Não foi possível a genotipagem do haplótipo  $\beta$ -tal

### 5.3.4 Identificação da deleção Corfu no gene *HBD*

O gráfico 3 demonstra o resultado do teste de na tentativa de identificação da deleção Corfu (NG\_000007.3:g.57237\_64443del7207) em cinco crianças com a mutação IVS-1-5 G>A. A deleção Corfu não foi detectada em nenhuma delas.

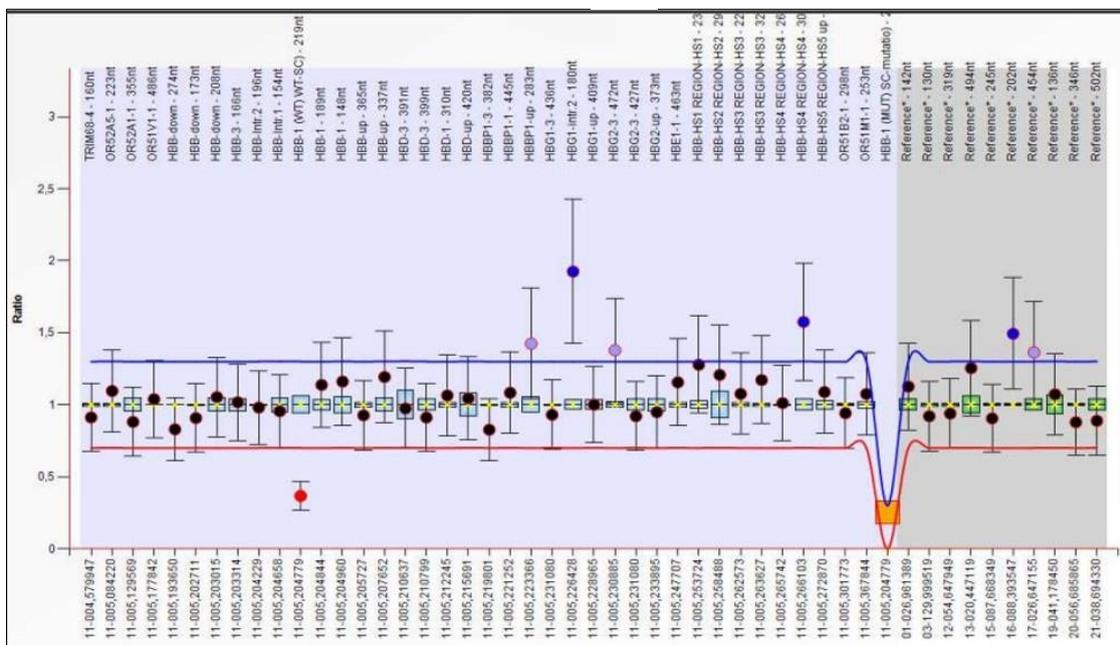


Gráfico 3 - Resultado do produto da reação de *MLPA* para identificação da deleção Corfu. Na região do gene *HBD*, em crianças com a mutação IVS-1-5 G>A, a deleção Corfu não foi detectada com as sondas “HBD-up 420 nt” e HBD-1 310 nt” que se aninham internamente à referida deleção.

### 5.3.5 Identificação Alfa Talassemia

Quanto à co-herança de alfa talassemia, 68 crianças (79,0%) tinham genótipo selvagem ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ); 16 (18,6 %) eram  $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ ; uma era (1,2%)  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$  e uma (1,2%) tinha triplicação do gene alfa ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha^{3.7}$ ). A figura 21 demonstra os resultados da *gap*-PCR para identificação de deleção de talassemia alfa ( $-\alpha^{3.7}$ ).

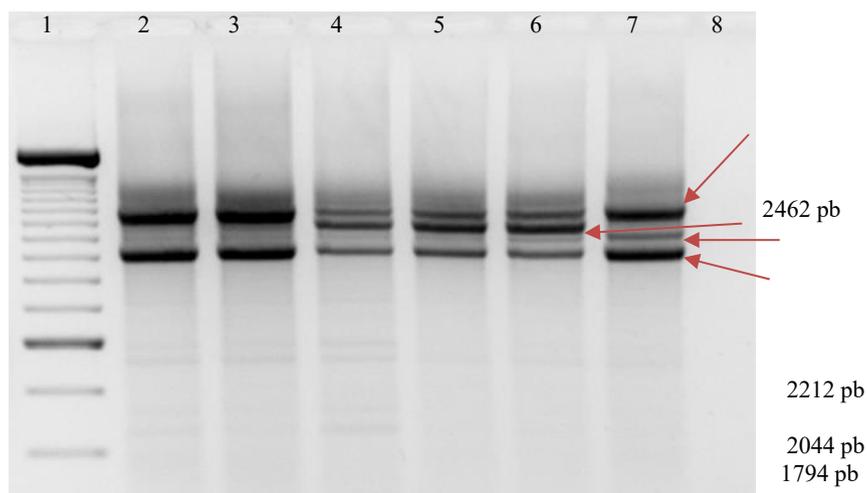


Figura 21- Fotografia do gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, contendo produtos de PCR múltipla para diagnóstico molecular de 2 deleções e triplicação no gene *HBA*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular de 250 pares de bases. Nas canaletas 1 e 2 amostras  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ , nas canaletas 4-6 amostras  $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ , na canaleta 7 controle positivo para  $\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha^{3.7}$  e na canaleta 8 controle negativo.

O gráfico 4 demonstra os resultados dos exames de alfa talassemia, distribuídos de acordo com o tipo de mutação.

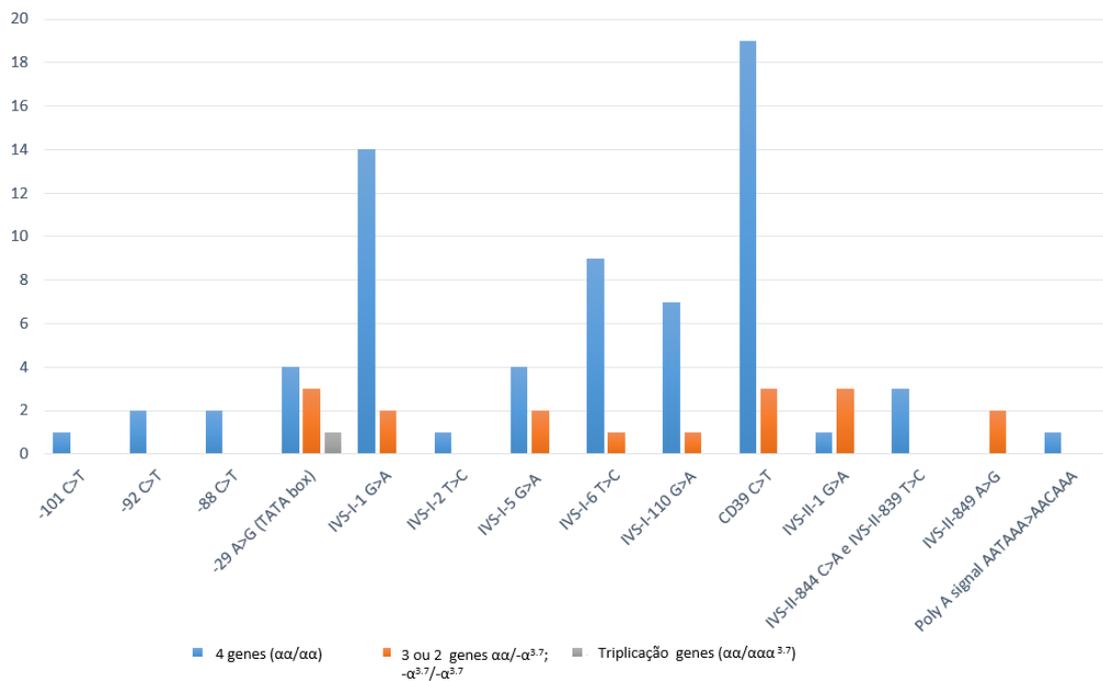


Gráfico 4 - Distribuição das mutações do alelo beta-talassêmico, de acordo com a quantidade de genes da alfa globina.

#### 5.4 Caracterização dos parâmetros hematológicos

Os valores dos exames hematológicos variaram de acordo com o tipo de mutação da beta-talassemia. Para as mutações que apresentavam frequência igual ou superior a dois casos na casuística, calculou-se a média dos valores hematológicos para essas mutações, com o respectivo erro padrão da média (tabela 10).



As médias dos valores de HbA foram representadas no gráfico 5. Mutações tidas como  $S\beta^+$ -tal comportaram-se com Hb A igual a zero (IVS-I-5 G>A) ou inferior a 10% (IVS-I-110 G>A).

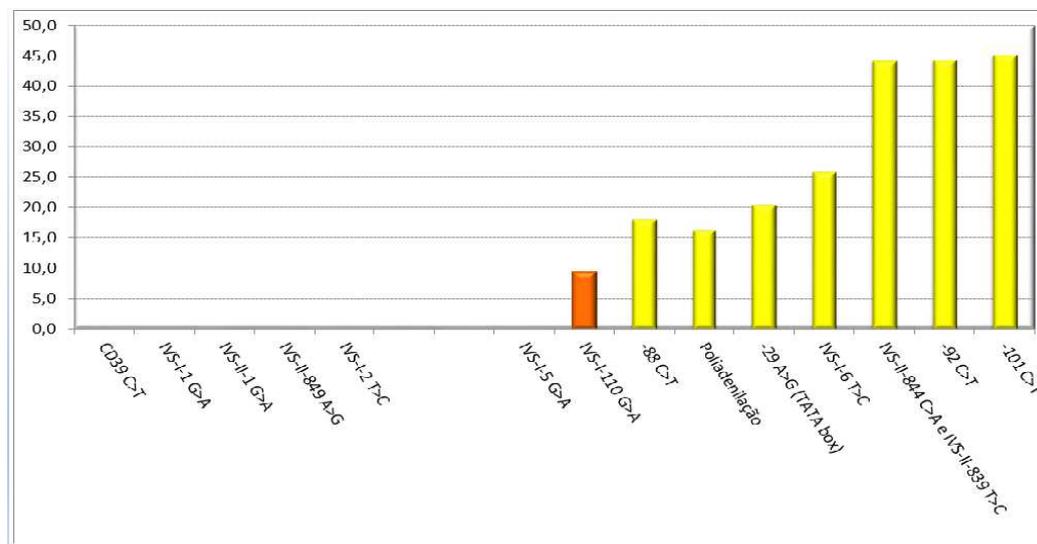


Gráfico 5 – Distribuição dos valores da concentração de HbA de acordo com o tipo de mutação.

De uma forma geral, nota-se pelo gráfico 5 que as diversas mutações de  $S\beta$ -tal distribuem-se em quatro grupos quanto à concentração de HbA: no primeiro, não existe produção de HbA e compreende todas os genótipos  $S\beta^0$ -tal, acrescidos da mutação IVS-I-5 G>A, na qual nenhuma das cinco crianças apresentou HbA à HPLC, em qualquer momento da vida. O segundo grupo compreende na presente casuística apenas a mutação IVS-I-110 G>A na qual a concentração relativa de HbA é inferior a 10%. Examinando-seretrospectivamente os oito casos da presente casuística, percebeu-se que o nível de HbA natriagem neonatal pode ser tão baixo que não é detectável por IEF ou HPLC, tendo sido o perfil de hemoglobina desses recém-nascidos classificado como FS. O terceiro grupo, com diminuição moderada de HbA, compreende as mutações -29 A>G e -88 C>T, na região promotora, a de poliadenilação na região 3' de *HBB* e a mutação IVS-I-6 T>C. O último grupo, com pequenas restrições na produção da HbA, compreende duas mutações na região promotora, -101 C>T e -92 C>T, e mais uma quase na região de *splicing* receptor no segundo íntron de *HBB*, uma dupla mutação em *cis* separada por 4 bases: 839 T>C e 844 C>A (Gráfico 6).

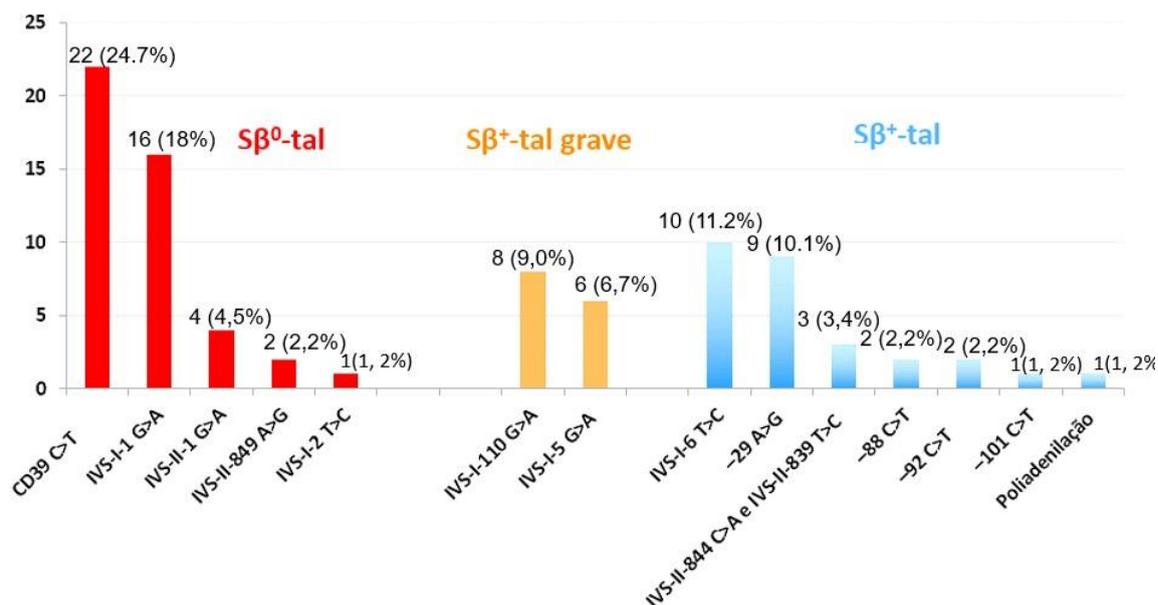


Gráfico 6 Distribuição dos grupos de Sβ-tal de acordo com o tipo de mutação.

A tabela 11 mostra a comparação dos valores hematimétricos entre as mutações IVS-I-1 G>A vs CD 39 C>T; IVS-I-5 G>A vs CD 39 C>T e IVS-I-110 G>A vs CD 39 C>T. A tabela 8 compara, uma a uma, CD 39 C>T com -29 A>G e IVS-I-6 T>C. Já a tabela 9 compara as mutações de Sβ<sup>+</sup>-talassemia consideradas leves (-101 C>T, -92 C>T e IVS-II-839 T>C / IVS-II-844 C>A em *cis*) com as mutações consideradas moderadas (IVS-I-6 T>C e -29 A>G).

Tabela 11 - Comparação de valores hematimétricos entre quatro genótipos de mutação de Sβ-talassemia

	a. CD39 C>T	b. IVS-I-1 G>A	c. IVS-I-5 G>A	d. IVS-I-110 G>A	Valor* de p (a vs b)	Valor* de p (a vs c)	Valor* de p (a vs d)
Hb total (g/dL)	8,09±0,17	7,80±0,20	8,62±0,49	8,28±0,57	0,28	0,35	0,77
Hb F (%)	15,5±1,7	11,4±2,1	10,9±2,9	9,8±3,0	0,14	0,21	0,10
Hb A2 (%)	5,1± 1,1	6,1±1,0	6,3±0,7	6,1± 0,7	<b>0,013</b>	<b>0,006</b>	<b>0,003</b>
Reticulócitos (%)	11,4±0,8	12,4±1,1	10,3±1,9	10,3±1,9	0,49	0,51	0,48
Leucócitos (x10 <sup>9</sup> /L)	11,69±0,64	13,28±0,91	15,22±2,05	14,81±1,38	0,15	0,15	<b>0,027</b>
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	355,45±27,85	398,57±27,16	380,62±60,51	324,61±41,03	0,28	0,69	0,54
VCM (fL)	74,5±1,5	71,0±1,2	68,8±1,0	69,7±1,8	0,08	<b>0,004</b>	0,054
HCM (pg)	23,2±0,5	21,5±0,5	20,5±0,7	22,0±0,5	<b>0,03</b>	<b>0,019</b>	0,11

\*Os valores de p que são significativos estão **em negrito**.

Nota-se, pela Tabela 11, que os quatro genótipos não diferem significativamente entre si quanto aos parâmetros hematológicos, exceto no que se refere à concentração relativa de Hb A2, mais baixa em CD39 C>T no que nos demais genótipos. Também nota-se pequenas diferenças no que tange a VCM e HCM, com valores mais elevados em CD39C>T.

Tabela 12 – Comparação de valores hematimétricos entre três genótipos de mutação de Sβ-talassemia.

	a. CD39 C>T	b. -29 A>G	c. IVS-I-6 T>C	Valor de p (a vs b)	Valor de p (a vs c)	Valor de p (b vs c)
Hb total (g/dL)	8,09±0,17	11,37±0,27	10,44±0,21	<b>&lt;0,0000001</b>	<b>&lt;0,0000001</b>	<b>0,013</b>
Hb F (%)	15,5±1,7	7,8±1,1	3,0±0,7	<b>0,0008</b>	<b>&lt;0,0000001</b>	<b>0,004</b>
Hb A2 (%)	5,1± 1,1	5,9±1,1	4,8 ±0,8	0,14	0,94	0,15
Reticulócitos (%)	11,4±0,8	2,7±0,4	3,4±0,6	<b>&lt;0,0000001</b>	<b>&lt;0,0000001</b>	0,39
Leucócitos (x10 <sup>9</sup> /L)	11,69±0,64	8,81±0,78	8,53±0,60	<b>0,015</b>	<b>0,001</b>	0,78
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	355,45±27,85	274,91±17,26	265,24±20,76	<b>0,02</b>	<b>0,015</b>	0,73
VCM (fL)	74,5±1,5	73,1±1,7	69,5±1,7	0,6	0,052	0,15
HCM (pg)	23,2±0,5	23,5±0,6	22,0±0,5	0,7	0,17	0,06

\*Os valores de p que são significativos estão **em negrito**.

Nota-se, pela Tabela 12, que as crianças com CD39 C>T possuem valores mais baixos de Hb total, a par de maior elevação dos reticulócitos, leucócitos e plaquetas, e do valor relativo da HbF. A concentração de HbA2, bem como os valores de VCM e HCM são equivalentes entre os três genótipos comparados na Tabela 12.

Tabela 13– Comparação de valores hematimétricos ( $\pm$  erro padrão da média) entre dois genótipos de  $S\beta^+$ -talassemia moderada e três genótipos de  $S\beta^+$ -talassemia leve

	a.IVS-I-6 T>C e -29 A>G (n=19)	b. -101 C>T, -92 C>T e IVS-II- 844 C>A <i>cis</i> IVS-II-839 T>C (n=6)	Valor de p (a vs b)
<b>Hb total (g/dL)</b>	10,88 $\pm$ 0,20	12,73 $\pm$ 0,29	<b>0,0008</b>
<b>Hb A (%)</b>	23,58 $\pm$ 0,38	44,38 $\pm$ 0,38	<b>&lt;0,0000001</b>
<b>Hb F (%)</b>	5,27 $\pm$ 0,85	1,58 $\pm$ 0,29	<b>0,001</b>
<b>Hb A2 (%)</b>	5,18 $\pm$ 0,24	4,42 $\pm$ 0,09	<b>0,008</b>
<b>Reticulócitos (%)</b>	3,06 $\pm$ 0,34	1,13 $\pm$ 0,14	<b>0,0003</b>
<b>Leucócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	8,66 $\pm$ 0,47	7,41 $\pm$ 0,87	0,25
<b>Plaquetas (x10<sup>9</sup>/L)</b>	269,8 $\pm$ 13,3	324,7 $\pm$ 40,6	0,25
<b>VCM (fL)</b>	71,2 $\pm$ 1,3	77,6 $\pm$ 0,9	<b>0,001</b>
<b>HCM (pg)</b>	22,7 $\pm$ 0,4	25,2 $\pm$ 0,5	<b>0,004</b>

\*Os valores de p que são significativos estão **em negrito**.

Nota-se, pela tabela 13, que é bastante acentuada a diferença entre os parâmetros hematológicos dos genótipos “leve” e “moderado” da  $S\beta^+$ -talassemia, encontrados no presente estudo. As exceções ficaram por conta das contagens de leucócitos e plaquetas, equivalentes para os dois grupos mencionados.

A tabela 14 compara parâmetros hematológicos entre as duas mutações  $S\beta^0$ -Tal mais prevalentes no presente estudo (CD 39 C>T e IVS-I-1 G>A), quanto à co-herança de alfa talassemia. Todas as médias são equivalentes sob o ponto de vista estatístico.

Tabela 14- Comparação hematológica entre as mutações CD 39 C>T e IVS-I-1 G>A em relação à co-herança de alfa talassemia.

	Co-herança de alfa talassemia em CD39 C>T	Média	Valor de p	Co-herança de alfa talassemia em IVS-I-1 G>A	Média	Valor de p
Hb total (g/dL)	4 genes (n=19)	8.0	0.44	4 genes (n=14)	7.9	0.37
	2 ou 3 genes (n=3)	8.4		2 ou 3 genes (n=2)	7.3	
Reticulócitos (%)	4 genes (n=19)	11.6	0.49	4 genes (n=14)	12.6	0.59
	2 ou 3 genes (n=3)	10.1		2 ou 3 genes (n=2)	11.0	
Hb F (%)	4 genes (n=19)	15.5	0.91	4 genes (n=14)	12.0	0.24
	2 ou 3 genes (n=3)	16.0		2 ou 3 genes (n=2)	7.4	
Hb A2 (%)	4 genes (n=19)	4.9	0.50	4 genes (n=14)	5.7	0.17
	2 ou 3 genes (n=3)	4.5		2 ou 3 genes (n=2)	6.8	
Leucócitos (x10 <sup>9</sup> /L)	4 genes (n=19)	11.49	0.45	4 genes (n=14)	13.33	0.90
	2 ou 3 genes (n=3)	12.94		2 ou 3 genes (n=2)	12.96	
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	4 genes (n=19)	346.41	0.58	4 genes (n=14)	409.73	0.49
	2 ou 3 genes (n=3)	412.67		2 ou 3 genes (n=2)	320.45	
VCM (fL)	4 genes (n=19)	73.4	0.38	4 genes (n=14)	70.6	0.50
	2 ou 3 genes (n=3)	81.8		2 ou 3 genes (n=2)	74.5	
HCM (pg)	4 genes (n=19)	22.7	0.24	4 genes (n=14)	21.4	0.36
	2 ou 3 genes (n=3)	26.2		2 ou 3 genes (n=2)	22.8	

## 1.5 Caracterização clínica

Todos os dados referentes aos eventos clínicos foram extraídos dos prontuários médicos da Fundação Hemominas. Como anteriormente referido, foram considerados os registros antes do início do uso da hidroxiureia ou do regime de hipertransfusão.

Quanto ao exame de Doppler transcraniano, 70 crianças realizaram o exame até a data final de acompanhamento do estudo. Entre elas, 66 (94,3%) apresentaram baixo risco para doença cerebrovascular e duas (2,9%), risco condicional baixo. Uma criança (1,4%) teve acidente vascular cerebral (AVC) e uma, ataque isquêmico transitório (AIT). Os dois resultados de DTC condicional baixo foram observados em crianças com as mutações IVS-I-5 G>A e IVS-I-110 G>A. O único caso de AVC foi observado em uma criança com a mutação CD 39 C>T e o caso de AIT foi observado em criança com mutação IVS-I-1 G>A, ambas S $\beta^0$ -tal.

Na presente casuística, 60 crianças (69%) não apresentaram aumento considerável do baço e 27 (31%) apresentaram esplenomegalia. Dentre estas, 23 (85,2%) eram S $\beta^0$ -tal e 4 (4,2%) eram S $\beta^+$ -tal. No genótipo S $\beta^+$ -tal a esplenomegalia foi observada nas crianças com a mutação IVS-I-110 G>A. Apenas as crianças com a mutação IVS II 849 A>G (S $\beta^0$ -tal), não apresentaram eventos de esplenomegalia. Cabe resaltar que esplenomegalia causou hiperesplenismo clínico em três crianças (11,1%).

Ainda de forma global e em termos absolutos, das 87 crianças com a mutação  $\beta$ -talassemia identificada, 73 (83,9%) tiveram registro de CVO, totalizando 665 eventos durante o acompanhamento; 14 (16,1%) das crianças não tiveram registro de CVO.

Em relação a infecções, apenas 5 crianças (5,7%) não tiveram registro do evento nos prontuários médicos. Os genótipos que mais frequentemente associaram-se com infecção foram CD39 C>T e IVS-I-1 G>A. Em relação à síndrome torácica aguda, 48 crianças (55,2%) tiveram pelo menos um episódio durante o seguimento clínico. Os genótipos que mais frequentemente se associaram a esse evento agudo foram, CD39 C>T e IVS-I-5 G>A. Em relação a transfusões sanguíneas, 49 crianças (56,3%) receberam pelo menos uma transfusão, sendo igualmente mais frequentes nos mesmos genótipos já assinalados.

Levando-se em conta que o tempo de seguimento foi variável de criança para criança, como acontece com qualquer coorte, normatizou-se a frequência de eventos clínicos por 100 pacientes-ano. A incidência de crises vaso-oclusivas para os 87 pacientes com a mutação  $\beta$ -tal identificada foi de 83,6 eventos por 100 pacientes-ano (IC 95%: 77,4 – 90,2). A incidência de infecções foi de 65,0 eventos por 100 pacientes-ano (IC 95%: 72,9 – 85,4). A incidência de síndrome torácica aguda foi de 12,9 por 100 pacientes-ano (IC 95%: 12,0 – 17,4) e a de transfusões foi de 16,9 por 100 pacientes-ano (IC 95%: 19,8 – 26,6). A tabela 15 demonstra essas incidências de eventos clínicos por cada um dos genótipos de  $\beta$ -tal.

Tabela 15 - Incidência de eventos clínicos por 100 pacientes-ano.

Mutação (n)	Incidência de infecção (IC 95%)*	Incidência de CVO (IC 95%)*	Incidência de STA (IC 95%)*	Incidência de transfusão (IC 95%)*
-101 C>T (1)	12,7 (1,54-45,8)	12,7(1,54-45,8)	0	0
-92 C>T (2)	34,6(14,9-68,2)	13 (2,68-37,9)	0	0
-88 C>T (2)	18,2(5,9-42,4)	3,63(0,09-20,3)	0	0
-29 A>G (9)	54(39,4-72,3)	32,4(21,4-47,2)	8,4(3,4-17,3)	1,2(0,03-6,7)
IVS-I-1 G>A (16)	122,6(105,1-142,6)	114,6(97,3-133,9)	40,1(30,2-52,2)	44,5(34,1-57,2)
IVS-I-2 T>C (1)	94,8(47,3-169,7)	86,2(41,3-158,5)	25,9(5,3-75,6)	60,3(24,3-124,3)
IVS-I-5 G>A (6)	105(68-155,1)	137,5 (94-194,1)	25,8(9,5-56,1)	12,6(2,6-36,8)
IVS-I-6 T>C (10)	61,6(48,8-77,2)	114,2(96-134,9)	7,4(3,4-14)	3,3(1-7,9)
IVS-I-110 G>A (8)	109,2(85,8-137,1)	73,8(54,8-97,3)	8,9(3,3-19,3)	32,5(20,4-49,2)
CD 39 C>T (22)	89,6(76,9-103,9)	97,2(84-112)	10,6(6,6-16,3)	35,4(27,6-44,8)
IVS-II-1 G>A (4)	54,7(34,7-82,1)	45,2 (27,2-70,6)	11,9(3,9-27,8)	33,3(18,2-55,9)
IVS-II-839 T>C e IVS-II-844 C>A em <i>cis</i> (3)	18,9(6,9-44,1)	11,3(2,3-33,1)	0	0
IVS-II-849 A>G (2)	107,4(51,5-197,5)	139,6(74,4-23,9)	42,9(11,7-110)	0
Poliadenilação (1)	27,6(8,8-66,6)	148,1(91,7-226,4)	0	13,8(1,7-49,9)

\*IC 95% pelo teste exato de Fisher

CVO: crise vaso-oclusiva; STA: síndrome torácica aguda

As tabelas 16 a 18 comparam a incidência dos quatro eventos clínicos em alguns dos genótipos mais frequentes na casuística.

Tabela 16- Incidência de eventos clínicos em alguns dos genótipos mais frequentes da casuística.

Mutação (n)	Incidência de infecção (IC 95%)*	Incidência de CVO (IC 95%)*	Incidência de STA (IC 95%)*	Incidência de transfusão (IC 95%)*
a. CD39 C>T (22)	89,6(76,9-103,9)	97,2(84-112)	10,6(6,6-16,3)	35,4(27,6-44,8)
b. IVS-I-1 G>A (16)	122,6(105,1-142,6)	114,6(97,3-133,9)	40,1(30,2-52,2)	44,5(34,1-57,2)
c. IVS-I-5 G>A (6)	105(68-155,1)	137,5 (94-194,1)	25,8(9,5-56,1)	12,6(2,6-36,8)
d. IVS-I-110 G>A (8)	109,2(85,8-137,1)	73,8(54,8-97,3)	8,9(3,3-19,3)	32,5(20,4-49,2)
Valor* de p (a vs b)	<b>0,004</b>	0,14	<b>&lt;0,0000001</b>	0,23
Valor* de p (a vs c)	0,46	0,1	0,12	0,09
Valor* de p (a vs d)	0,18	0,09	0,89	0,83

\*IC 95% e testes comparativos pelo teste exato de Fisher; valores de p significativos, **em negrito**  
CVO: crise vaso-oclusiva; STA: síndrome torácica aguda

Pela tabela 16, nota-se que as crianças com CD39 C>T, em relação àquelas com IVS-I-1 G>A apresentaram incidência significativamente menor quanto às infecções e, principalmente, na incidência de síndrome torácica aguda. É relevante ressaltar que as crianças com as mutações IVS-I-5 G>A e IVS-I-110 G>A, tidas tradicionalmente como variantes S $\beta$ <sup>+</sup>- tal graves, tiveram incidências de eventos clínicos, no mínimo, equivalentes sob o ponto de vista estatístico às crianças com CD39 C>T. No caso de infecções, crises dolorosas e síndrome torácica aguda, a incidência nas crianças com IVS-I-5 G>A foi até mais alta do que em CD39 C>T, embora sem alcançar significância estatística.

Tabela 17- Comparação da incidência de eventos clínicos entre três genótipos de mutação de S $\beta$ -talassemia.

Mutação (n)	Incidência de infecção (IC 95%)*	Incidência de CVO (IC 95%)*	Incidência de STA (IC 95%)*	Incidência de transfusão (IC 95%)*
a. CD39 C>T (22)	89,6(76,9-103,9)	97,2(84-112)	10,6(6,6-16,3)	35,4(27,6-44,8)
b. -29 A>G (9)	54(39,4-72,3)	32,4(21,4-47,2)	8,4(3,4-17,3)	1,2(0,03-6,7)
c. IVS-I-6 T>C (10)	61,6(48,8-77,2)	114,2(96-134,9)	7,4(3,4-14)	3,3(1-7,9)
Valor* de p (a vs b)	<b>0,002</b>	<b>&lt;0,0000001</b>	0,76	<b>&lt;0,0000001</b>
Valor* de p (a vs c)	<b>0,007</b>	0,17	0,47	<b>&lt;0,0000001</b>
Valor* de p (b vs c)	0,55	<b>&lt;0,0000001</b>	0,99	0,65

\*IC 95% e testes comparativos pelo teste exato de Fisher; valores de P significativos, **em negrito**  
CVO: crise vaso-oclusiva; STA: síndrome torácica aguda

Pela Tabela 17, nota-se que as crianças com a mutação na região promotora -29 A>G e IVS-I-6 T>C têm curso clínico menos grave do que as com CD39 C>T. Comparando-se as duas mutações  $S\beta^+$ -talassemia, à exceção das crises dolorosas, muito mais frequentes nas crianças com IVS-I-6 T>C, elas realmente comportam-se como formas de gravidade clínica moderada.

Tabela 18 - Comparação da incidência de eventos clínicos entre dois genótipos de  $S\beta^+$ -talassemia moderada e três genótipos de  $S\beta^+$ -talassemia leve

Mutação (n)	Incidência de infecção (IC 95%)*	Incidência de CVO (IC 95%)*	Incidência de STA (IC 95%)*	Incidência de transfusão (IC 95%)*
a. IVS-I-6 T>C e -29 A>G (n=19)	58,5 (48,5-70)	80,1 (69,1-94,3)	7,81 (4,46-12,68)	2,44 (0,79-5,69)
b. -101 C>T, -92 C>T, e IVS-II-839 T>C e IVS-II- 844 C>A em <i>cis</i> (n=6)	23 (12,8-37,9)	12,2 (5,3-24,1)	0 (0, 5,61)	0 (0, 5.61)
<b>Valor* de p (a vs b)</b>	<b>0,0002</b>	<b>&lt;0,0000001</b>	<b>0,02</b>	<b>0,5</b>

\*IC 95% e testes comparativos pelo teste exato de Fisher; valores de P significativos, **em negrito**  
CVO: crise vaso-oclusiva; STA: síndrome torácica aguda

Pela tabela 18, nota-se claramente que as crianças com formas consideradas de  $S\beta^+$ -talassemia leve realmente possuem curso clínico mais leve do que formas moderadas de  $S\beta^+$ -talassemia.

A tabela 19, demonstra os dados de eventos clínicos por 100 pacientes-ano referente à co-herança de alfa talassemia.

Tabela 19 Eventos clínicos por 100 pacientes-ano em relação à co-herança de alfa talassemia.

Co-herança de alfa talassemia	Incidência de infecção (IC 95%)*	Incidência de CVO (IC 95%)*	Incidência de STA (IC 95%)*	Incidência de transfusão (IC 95%)*
<b>a. 4 genes (n=10)</b>	89,9 ( 76,1-105,5)	102,5( 87,7-119)	10,2(5,9-16,3)	38,9(30,1-49,6)
<b>b. 2 ou 3 genes (n=10)</b>	88,4 (58,2-128,6)	68,7(42,5-105,1)	13,1(3,5-33,5)	16,4(5,3-38,2)
<b>Valor* de p (a vs b)</b>	1	0,09	0,83	0,06

\*IC 95% pelo teste exato de Fisher

CVO: crise vaso-oclusiva; STA: síndrome torácica aguda

Ainda quanto aos quatro eventos clínicos considerados, o grupo mais numeroso de crianças com CD39 C>T (n=22) foi analisado quanto a pertencerem ao subgrupo com haplótipo  $\beta^S$  CAR ou Benin. As incidências de transfusões sanguíneas e de crises dolorosas foram equivalentes nos dois subgrupos (p=0,58 e p=0,75, respectivamente). As crianças com o haplótipo Benin apresentaram incidência de infecções e de síndrome torácica aguda um pouco superior às crianças com CAR (p=0,04 e p=0,03, respectivamente).

Em relação ao sequestro esplênico agudo, 32 (35,9%) dos pacientes tiveram pelo menos um episódio. Entre eles, seis (18,8%) em crianças tidas como  $S\beta^+$ -tal (mutações IVS-I-6 T>C e IVS-I-110 G>A) e 26 (81,2%) em crianças  $S\beta^0$ -tal.

O gráfico 7 mostra a curva de eventos de SEA de acordo com a idade ao primeiro evento de SEA. A idade do primeiro episódio variou de 5 meses a 7 anos e 7 meses. A probabilidade estimada de SEA foi de  $41,2\% \pm 5,7\%$ .

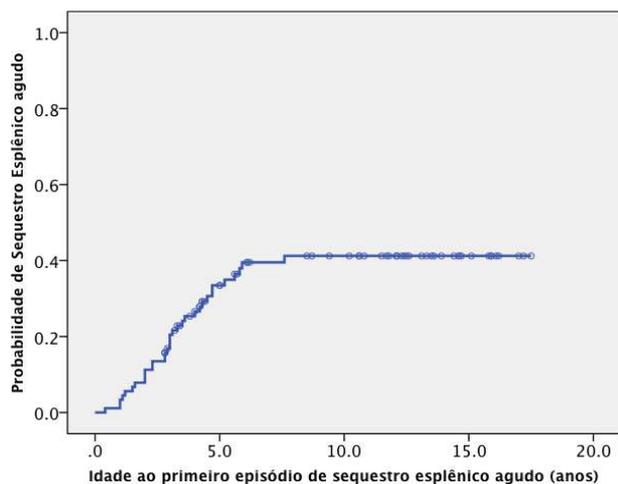


Gráfico 7 - Curva de probabilidade de ocorrência do primeiro episódio de SEA; método de Kaplan-Meier, função (1-Sobrevida).

O gráfico 8 demonstra a comparação das curvas relativas ao primeiro episódio de SEA entre as crianças com mutações CD39 C>T e IVS-I-1 G>A ( $p=0,68$ ).

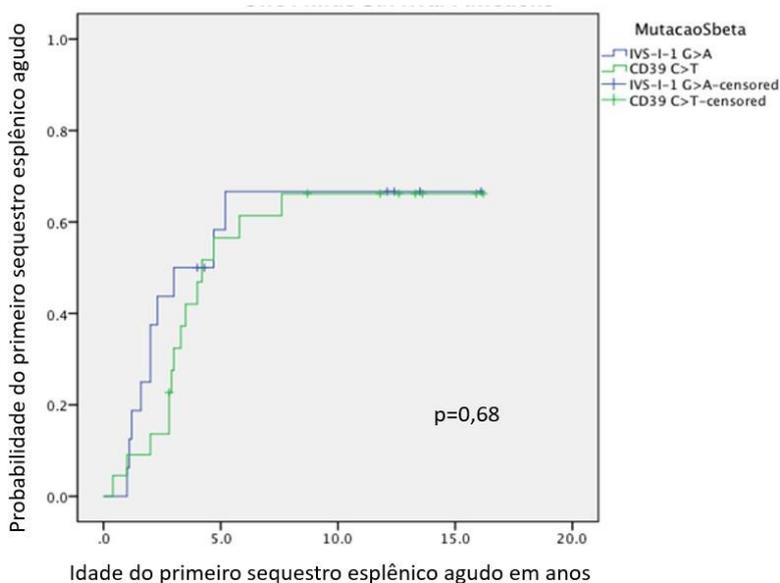


Gráfico 8 - Curva de probabilidade de ocorrência do primeiro episódio de SEA entre as mutações CD39 C>T e IVS-I-1 G>A; método de Kaplan-Meier, função (1-Sobrevida). A diferença entre as curvas não é estatisticamente significativa ( $p=0,68$ ).

Em relação aos dois haplótipos  $\beta^S$  mais incidentes, CAR e Benin, nas crianças com CD39 C>T, também não se constatou diferença significativa na probabilidade do primeiro episódio de SEA (gráfico 9;  $p=0,98$ ).

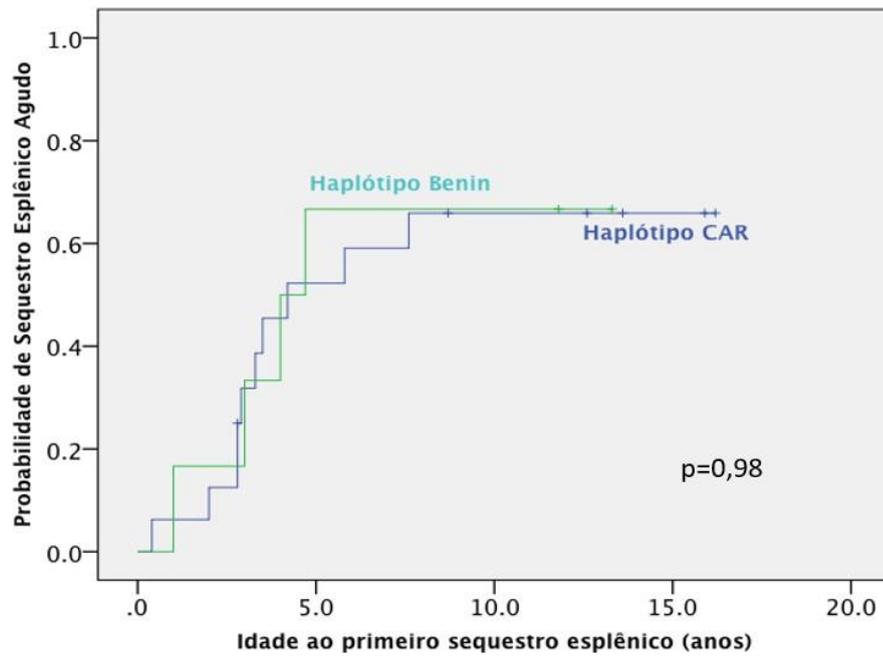


Gráfico 9 - Curva de probabilidade de ocorrência do primeiro episódio de SEA entre os haplótipos  $\beta^S$  CAR e Benin nas 22 crianças com a mutação CD39 C>T; método de Kaplan-Meier, função (1-Sobrevida). A diferença entre as curvas não é estatisticamente significativa ( $p=0,98$ ).

## 6 DISCUSSÃO

As doenças falciformes são reconhecidas como problema de saúde pública no mundo e no Brasil. A população brasileira é caracterizada pela miscigenação, com grande contingente de imigrantes oriundos do continente africano e de países europeus (9,157). Dados censitários estimam que mais de 5,5 milhões imigrantes portugueses, italianos e árabes foram recebidos durante o fluxo migratório para o Brasil (13).

O presente estudo é o primeiro em realizar no estado de Minas Gerais a investigação da associação entre a HbS e as mutações da beta talassemia, os haplótipos da beta globina, haplótipos da beta talassemia e co-herança da alfa talassemia. A relevância deste estudo está relacionada também pela quantidade e a variabilidade dos tipos de mutações encontradas. Determinante no percentual da HbA, essas mutações são fatores importantes na fisiopatologia da doença S $\beta$ -Talassemia (68). Contudo, cabe ressaltar que ao se comparar a presente casuística com a literatura disponível, observa-se que existem poucos estudos. Além disso, esses estudos apresentam variabilidade de metodologias, número amostral, tempo de acompanhamento, idade e mutações identificadas, dessa forma, impossibilita comparações mais precisas.

Inicialmente, a casuística foi composta por 127 crianças com perfil eletroforético sugestivo de S $\beta$ -Tal. Com a realização do sequenciamento, foi possível identificar que algumas dessas crianças eram portadoras de outras hemoglobinopatias, entre elas, a Hb S/Hb Porto Alegre, HbSS, Hb S/Hb Saki Hb S/Hb Koln e Hb S/Yaizu. Essas hemoglobinas apresentam características que podem dificultar o diagnóstico diferencial com S $\beta$ <sup>+</sup> pelos métodos de IEF e/ou HPLC. Na literatura, alguns relatos de casos de pacientes classificados inicialmente como HbSS ou traço falciforme e, após a genotipagem, reavaliados como S $\beta$ -Tal (66,94). Em um dos relatos, o probando diagnosticado inicialmente como traço falciforme e que, ao apresentar manifestações clínicas características de doença falciforme, foi submetido a testes moleculares de *MLPA*, e constatando-se que se tratava de uma deleção na região de  $\beta$ -LCR e na verdade, o fenótipo correspondia a uma S $\beta$ <sup>+</sup>-Tal (94). Evidencia-se, dessa maneira, a importância do uso da biologia molecular para a acurácia do diagnóstico.

Em nosso estudo, o sequenciamento gênico permitiu a identificação de quatorze tipos de mutações causadoras de beta-talassemia das crianças atendidas no Hemocentro de Belo Horizonte. Em duas crianças, não foi possível detectar nenhuma mutação pontual. Possivelmente, o fenótipo beta-talassêmico está relacionado com outra herança genética, como deleções que, embora raras, são possíveis(71). Nesse caso, seria necessária a aplicação de outra metodologia para a identificação da mutação.

As talassemias têm maior prevalência no Mediterrâneo e a sua distribuição no Brasil se deve ao processo migratório e de miscigenação. As regiões sul e sudeste apresentam maior prevalência de síndromes talassêmicas, devido às características da composição racial de caucasoides nessas regiões (22). Ao se comparar a casuística com outros estudos sobre a identificação das mutações causadoras da beta talassemia no Brasil, observa-se que o padrão do fluxo gênico é heterogêneo entre as regiões (16,18,112). . A mutação mais prevalente encontrada nesta casuística foi a CD39 C>T, corroborando com estudos anteriores realizados na região sudeste (108,109,113,114). Em um estudo de metanálise (162), a mutação CD39 C>T foi a mais prevalente em Portugal, seguida das mutações IVS-I-1 (G>A), IVS-1-6 (T>C) e IVS-1-110 (G>A).

Durante a colonização, os principais grupos trazidos pelos navios negreiros foram oriundos das regiões de Bantu (CAR) e Benin (12). Isso é corroborado com os resultados encontrados neste estudo sobre a maior frequência dos haplótipos CAR (58,1%) e Benin (29,1%). Além disso, outros estudos realizados no estado de Minas Gerais igualmente detectaram, também, a maior frequência dos haplótipos CAR e Benin em indivíduos com as doenças falciformes Hb SS e Hb SC (163,164), sugerindo o mesmo padrão de ancestralidade dos alelos  $\beta^S$ . Acredita-se que os haplótipos possam interferir na gravidade da doença falciforme, possivelmente pela influência na concentração de HbF, sendo observado maiores níveis de HbF nos haplótipos Senegal e Árabe-Indiano (125,126). No presente estudo, não foi observada diferença com impacto clínico nas características fenotípicas dos indivíduos com os haplótipos CAR e Benin, assim como constatado anteriormente em nossas coortes de crianças HbSS e HbSC (163,164).

Os haplótipos do alelo beta-talassêmico, assim como os haplótipos  $\beta^S$ , têm papel fundamental no estudo da origem e distribuição dos alelos entre as populações. Por outro lado, grande parte dos estudos não avaliou a influência dos haplótipos beta- talassêmicos nos desfechos clínicos nem das talassemias, nem de pacientes com S $\beta$ -Tal. Em um estudo

recente (99) realizado na Índia, foi sugerido que os pacientes com haplótipo III teriam manifestações clínicas mais graves. Apenas um tipo de mutação (IVS-I-5 G>C) e um tipo de haplótipo  $\beta^S$  (Árabe-indiano) foram incluídos nesse estudo, o que torna mais adequadas as comparações entre haplótipos de beta talassemia. Os haplótipos com maior frequência no presente estudo foram V (27,9%), II (15,2%) e I (13,9%) foram identificados principalmente nas mutações de origem europeia, como a IVS-I-110 G>A e a CD 39 C>T. Entretanto, alguns haplótipos são de origem africana, como os identificados nas mutações -29 C>T e - 88 C>T. Os haplótipos beta-talassêmicos não são restritos a uma única mutação e apresentam heterogeneidade em sua distribuição (120). Algumas mutações apresentaram padrões diferentes dos haplótipos beta-talassêmico originalmente descritos por Orkin (120). Entre elas a IVS-I-II T>C [ +-+ ], IVS II-849 C>A e IVS-II-839T>C *in cis* [----++-+] e IVS-II- A>G [ --+--- ]. Cabe ressaltar que não há na literatura, outros estudos que descrevem esses padrões polimórficos nessas mutações.

As comparações dos parâmetros hematológicos e clínicos entre  $S\beta^0$ -Tal e  $S\beta^+$ -Tal demonstraram que as mutações do alelo  $\beta$ -talassêmico são o principal fator modulador e o percentual relativo de HbA tem efeito protetor com relação à morbidade da doença, provavelmente, devido a diminuição da polimerização, falcização de hemácias e demais efeitos fisiopatológicos (79). As mutações encontradas na presente casuística foram distribuídas em quatro grupos distintos de acordo com a gravidade clínica: o primeiro compreendendo todos genótipos sem produção de HbA, considerados como da  $S\beta^0$ -Tal: IVS-I-1 G>A, IVS-I-2 T>C, CD39 C>T, IVS-II-1 G>A e IVS-II-849 A>G. Além disso, foi incluída a mutação IVS-I-5 G>A, descrita na literatura como  $S\beta^+$ -Tal (71). Na casuística, nenhuma das crianças com essa mutação apresentou HbA detectável por HPLC. Os indivíduos com o genótipo  $S\beta^+$ -Tal foram distribuídos de acordo com a média de HbA e divididos entre grave, moderado e leve. Os indivíduos com a mutação IVS-I-110 G>A, com concentração relativa de HbA menor que 10%, foram incluídos no grupo das mutações  $S\beta^+$ -Tal graves. Foram incluídas no grupo moderado os indivíduos portadores das mutações - 29 A>G, -88 C>T, IVS-I-6 T>C e na região de poliadenilação, com concentrações de HbA entre 16% e 26%. A maioria das mutações consideradas leves foram observadas na região promotora, como a -101 C>T, - 92 C>T e a mutação IVS-II- 839 e IVS-II-844 *in cis*, com maiores níveis de HbA. Indivíduos com a mutação IVS-II- 839 e IVS-II-844 *in cis* apresentaram fenótipo clínico muito brando, correspondente ao

percentual elevado de HbA. A identificação das mutações tem bastante importância, portanto, já que o tipo de mutação é o principal fator que condiciona a gravidade clínica.

BO perfil hematológico de crianças com diferentes mutações  $S\beta^0$ -Tal, de formageral, é bastante semelhante. Isso sugere que as diferenças de perfil hematológico nas crianças com  $S\beta^+$ -Tal ocorrem essencialmente pelo percentual relativo de HbA. Na literatura, como os dados são escassos, é difícil realizar comparações mais sistemáticas. De forma geral, nas comparações feitas entre mutações causadoras de  $S\beta^0$ -Tal e mutações consideradas moderadas, observou-se maior comprometimento hematológico nos indivíduos  $S\beta^0$ -Tal (67,91). Por outro lado, nas comparações restritas a mutações moderadas (-29 A>G e IVS-I-6 T>C), houve diferenças significativas apenas em dois parâmetros, Hb total e HbF. No estudo de Donaldson (165) observou-se que as mutações em regiões promotoras, estão relacionadas a maiores níveis de HbF. Isso é corroborado pelas observações na presente casuística.

Quanto aos dados clínicos, a incidência de CVO é relativamente alta, pois 83,6% das crianças apresentaram pelo menos um episódio, o que indica que esse tipo de evento tem grande ocorrência na maioria dos genótipos. As crises vaso-oclusivas são uma das principais manifestações clínicas e sua patogênese envolve um complexo mecanismo (47,56). A manifestação clínica menos frequente foi a síndrome torácica aguda, com prevalência global de 12,9%. A avaliação dos dados clínicos entre as mutações revelou, de modo geral, que a incidência de eventos clínicos por 100 pacientes-ano foi semelhante nos genótipos  $S\beta^0$ -Tal e IVS-I-110 G>A. Esses dados podem ser explicados pela baixa concentração de HbA observada na IVS-I-110 G>A. No presente estudo, o nível médio de HbA observado nas crianças que possuíam a mutação IVS-I-110 G>A foi baixo,  $11,2 \pm 0,7$  %, corroborando os dados observados por Boletini (89) e Adekulie (68). Nesses estudos, a mutação IVS-I-110 G>A também foi associada a uma apresentação clínica mais grave. Esses dados sugerem que a quantidade baixa de HbA não é suficiente para reduzir a polimerização das HbS e falcização das hemácias, levando a uma apresentação clínica tão grave quanto a observada na  $S\beta^0$ -Tal. De forma semelhante, no estudo de Altay (90), os portadores da mutação IVS-I-110 G>A não apresentaram gravidade clínica significativamente diferente quando comparada à  $S\beta^0$ -Tal. No presente estudo, observou-se associação da mutação IVS-I-110 G>A ao haplótipo beta talassêmico I, corroborando

os achados de trabalhos anteriores (133,166,167). Esses dados sugerem origem europeia desse alelo no estado de Minas Gerais.

A mutação IVS-I-5 G>A é originalmente descrita como S $\beta^+$ -Tal (71). A mutação IVS-I-5 G>A afeta a sequência de consenso no sítio doador e diminui a eficiência do *splicing* (71,106). Essa mutação geralmente encontra-se associada com a deleção Corfu, uma das menores na região interveniente. Essa deleção pode fazer parte de um domínio onde a remoção da sequência de 72 kb está associada ao aumento da HbF. A deleção diminui a afinidade de fatores transcricionais, mas não inativa por completo a síntese da HbA (34, 35). Entretanto, o nível de HbA produzida é insuficiente para inibir a falcização (170). No estudo de Li e colaboradores, foram relatadas duas crianças hispânicas (irmãos) com essa mutação. Na triagem neonatal, elas foram diagnosticadas com padrão Hb FS. Sem relato de transfusão em um período de 10 meses, ambas apresentaram níveis de HbA < 5%. No Brasil, o estudo de Bezerra (21), relatou também essa mutação na região nordeste, com fenótipo grave. Tanto o estudo de Li e Bezerra, os autores não relataram a realização de testes para identificação da deleção de Corfu. Já na presente casuística, nenhuma das crianças apresentou percentual de HbA durante todo acompanhamento e a mutação não foi associada à deleção de Corfu. Não há estudo mais aprofundado sobre a modulação eventualmente determinado pela deleção Corfu. Além disso, outros fatores moleculares desconhecidos, também podem estar associados a essas modulações e ainda não foram descritos e requer um número amostral maior. De modo geral, os dados clínicos de quatro das seis crianças apresentaram risco condicional baixo no exame de Doppler. As incidências de infecção, STA e CVO foram maiores em relação as crianças com a mutação CD39 C>T, entretanto, sem valor significativo. Esses dados demonstram que o percentual de HbA não detectável nos indivíduos com essa mutação precisam de acompanhamento clínico conforme protocolo clínico destinado aos indivíduos S $\beta^0$ -Tal.

Sob o ponto de vista clínico, indivíduos com a mutação CD39 C>T apresentaram aspectos clínicos mais graves, com o único caso de AVC observado na casuística. Dos 22 pacientes com essa mutação, 14 (63,64%) tiveram SEA. A mutação foi associada ao haplótipo II do alelo beta talassêmico. Além desse haplótipo, em outros estudos observou-se a associação da mutação CD 39 C>T com os haplótipos I e IX (120,167). Ao analisar a influência dos haplótipos CAR e Benin nas manifestações clínicas dessa mutação, de modo geral, os dois subtipos comportaram-se de forma semelhante, com exceção para infecção e STA. As diferenças observadas corroboram a hipótese de que o haplótipo CAR leva a quadro clínico

mais grave. Entretanto, o impacto clínico não é significativo, visto que a diferença nas incidências dos eventos nas crianças com os haplótipos CAR e Benin é pequena, inviabilizando a utilização do haplótipo como marcador de gravidade da S $\beta$ -Tal.

Dentro do grupo das mutações que afetam o processamento do RNA, a troca de nucleotídeo guanina para adenina na posição IVS-I-I G>A, impede o processo de emenda normal e a produção de RNAm é abolida (71). Essa mutação é muito incidente nosul de Portugal e já foi descrita em menor proporção em outros países da bacia do Mediterrâneo (162,167). O haplótipo beta talassêmico mais frequente associado a mutaçãoIVS-I-1 G>A foi o haplótipo V. Essa mutação também é descrita em associação com os haplótipos I, III e IX em menor proporção (26). Um indivíduo com essa mutação apresentou um caso de ataque isquêmico transitório (AIT). Observou-se que houve mais registros de episódios de STA, maior número de casos com SEA e infecções em comparação com a CD 39 C>T. A STA foi aproximadamente quatro vezes mais incidentenas crianças com a mutação IVS-I-I G>A, possivelmente pelo maior percentual de HbF observado nas crianças com a mutação CD 39 C>T em relação a IVS-I-1 G>A. Não há naliteratura dados comparativos entre essas duas mutações beta talassêmicas, em relação às manifestações clínicas da S $\beta$ -Tal. Não houve diferença significativa entre indivíduos comgenótipo HbSS e aqueles com essas mutações quanto a ocorrência de STA no estudo de Adekile (68). No nosso estudo, as diferenças entre os vários genótipos ficaram prejudicadasno que tange ao acometimento neurológico, pois a incidência de AVC e, mesmo, de resultados de Doppler transcraniano, é muito baixa para que sejam encontradas diferençasestatisticamente significativas

Outras três mutações encontradas neste estudo afetam a região de junção de *splicing*, a IVS-I-II-T>C, IVS-II-I-G>A e IVS-II-849 A>G. Essa última ainda não foi relatada anteriormente no Brasil; tem maior distribuição entre os negros norte- americanos(71), e observada também na Venezuela (171) e Jamaica (170). Nos estudos brasileiros, a IVS-II-I-G>A foi descrita apenas no estado do Amazonas, com a frequência de 2,7%, sendo que não houve avaliação dos aspectos clínicos (18). Na presente casuística, o número de pacientes é muito baixo para se fazerem ilações mais detalhadas sobre o comportamento clínico e hematológico dessas mutações.

Na comparação entre os grupos de crianças portadoras das mutações consideradas moderadas (IVS-I-6 T>C e -29 A>G) e leves (-101 C>T, -92 C>T, e IVS-II-839 T>C *cis*

IVS-II- 844 C>A), notaram-se diferenças significativas nos eventos clínicos e nas características hematológicas. Sob o ponto de vista hematológico, com exceção do percentual de plaquetas e leucócitos, todos os parâmetros apresentaram diferenças significativas, principalmente o percentual de HbA. Em relação à incidência dos eventos clínicos, notou-se também acentuada diferença, com exceção da incidência de transfusão. A principal discrepância entre os grupos moderado e leve foi na incidência de crises de vaso-oclusão, muito mais frequentes nas crianças portadoras de mutações classificadas como moderadas. Esses dados mostram que a concentração de HbA é inversamente proporcional à gravidade clínica.

A mutação IVS-I-6 T>C foi a terceira mais frequente na presente casuística. Dados de Cabral (17) e Araújo (19) demonstraram que essa mutação é mais frequente na região nordeste do Brasil, com frequência de 53,8% e 62,8% respectivamente. O Doppler transcraniano indicou baixo risco de doença cerebrovascular e somente um paciente teve SEA. Entretanto, nove dos dez pacientes tiveram pelo menos uma CVO. Comparando-se com as crianças com a mutação -29 A>G, observou-se diferença significativa nos eventos de CVO. A taxa foi aproximadamente três vezes maior para as crianças com IVS-I-6 T>C. Nesses casos, as crianças portadoras dessas mutações, não apresentaram grandes discrepâncias em relação ao nível de HbA. Por outro lado, a média de HbF foi maior nas crianças com a mutação -29 A>G, sugerindo que o menor número de CVO possa estar relacionado a concentração de HbF. De forma geral, ambas foram consideradas moderadas, levando em consideração os outros eventos clínicos avaliados nessa casuística.

A prevalência de esplenomegalia nessa casuística foi de 31%. Em concordância com outros estudos (12,69). A prevalência foi maior em pacientes com o genótipo  $S\beta^0$ -Tal. Cabe ressaltar que somente as crianças  $S\beta^+$ -Tal com a mutação IVS I 110 G>A apresentaram esplenomegalia, sugerindo, mais uma vez, que o baixo percentual de HbA nesses casos não exime esses pacientes de terem manifestações clínicas similares às observadas em  $S\beta^0$ -Tal. Em outros estudos previamente publicados (70,72), os pacientes com  $S\beta^+$ -Tal foram mais propensos a ter esplenomegalia em comparação aos com  $S\beta^0$ -Tal. Entretanto, esses últimos estudos não avaliaram todos os possíveis moduladores que poderiam influenciar no desfecho clínico e, além disso, em alguns deles, o número amostral foi muito pequeno para comparações estatísticas.

Mutações nas regiões promotoras podem produzir percentual considerável de HbA (67). Dentro do grupo de mutações transcricionais, a mutação -101 C>T foi observada em apenas um (1,1%) caso. Descrita em outros estudos como uma mutação silenciosa, essa mutação afeta a caixa CACCC, levando à leve redução do nível transcrito do gene da  $\beta$ -globina (71,172,173). Embora o número amostral seja pequeno, os dados clínicos referentes a essa criança estão de acordo com o descrito na literatura (172,173). O nível de HbA de 45,1 (g/dL) explica o fenótipo oligossintomático (67).

A mutação - 92 C>T é reportada na Sicília. Na presente casuística, foi associada a nível elevado de HbA, corroborando outros estudos que a caracterizaram como uma mutação silenciosa que leva a um fenótipo quase assintomático (71,84,88). Os parâmetros hematológicos encontravam-se dentro da faixa dos valores de referência, com exceção da HbF e a HbA<sub>2</sub>. As crianças portadoras dessa mutação não apresentaram manifestações clínicas como esplenomegalia, SEA, STA e CVO. Geralmente, níveis de HbA superiores a 30% levam a um curso clínico mais brando (87).

A troca do nucleotídeo citosina por timina diminui a transcrição do gene da beta-globina devido à redução da ligação por fatores transcricionais e promove a transcrição da cadeia delta. Essas alterações são desencadeadas pela mutação na região promotora, a - 88 C>T. Ela possui maior incidência em negros americanos, africanos e indianos (71,174). Já na população em estudo, apresentou uma frequência de 3,3%. O nível médio de HbA produzida foi de 15,1%  $\pm$  6,0. Os valores de HbF 13,3 g/dL ( $\pm$  8,1) estão de acordo com a literatura (174). Em outro estudo, realizado na Jamaica, as comparações entre os índices hematológicos das mutações que causam  $S\beta^+$ -Tal (-88 C>T, -29 A>G, IVS-6 T>C e Poli A (67) revelaram que dentre essas mutações, a -88 C>T apresentou níveis maiores de HbF, VCM e HCM. No presente estudo, as manifestações clínicas dos portadores dessa mutação foram brandas, com apenas um episódio STA relatado, além de baixo risco para doença cerebrovascular pelo exame de Doppler.

A mutação - 29 TATA box, embora frequentemente relacionada a apresentação clínica branda, foi associada em outros estudos a desfechos clínicos mais graves relacionados com a viscosidade do sangue (67,81). Na presente casuística, as crianças com a mutação - 29 TATA box apresentaram uma média de três CVO, com número máximo de onze

episódios. Dos nove pacientes com essa mutação, cinco tiveram STA e em média de 2 ( $\pm 3,4$ ) episódios no período. A mutação – 29 TATA box ocorreu em conjunto com os haplótipos  $\beta$ -Tal I e IX, dado que corrobora estudo previamente publicado(166).

A clivagem do transcrito de RNA precisa ser eficiente em ambas as extremidades 5' e 3'(71). Mutações na região conservada AATAAA modificam uma porção do sinal de reconhecimento para clivagem do precursor mRNA da beta-globina, formando transcritos de RNA longos (71,120). A mutação na região de poliadenilação AATAAA>AACAA tem origem étnica entre negros norte-americanos (71). A frequência na presente casuística foi muito baixa, apenas uma criança (1,1%). O percentual médio de HbA observado foi de 16,4%. Dados comparativos de Serjeant sobre as mutações do tipo III, a poli A apresentou menores níveis de Hb A2, HbF, Hb, VCM e HCM e maiores níveis de reticulócitos em relação a -88 C>T (67). Esses achados são semelhantes ao do presente estudo. A criança que possuía essa mutação apresentou baixo risco para doença cerebrovascular e ausência de manifestações clínicas como esplenomegalia, STA e SEA.

Os parâmetros hematológicos e clínicos da doença falciforme podem ser influenciados também pela co-herança da alfa talassemia (151). Entre as crianças que realizaram os exames para o diagnóstico da co-herança da alfa talassemia, 22,7% apresentaram um ou dois genes alfa afetados.

Os efeitos da co-herança da alfa-talassemia em indivíduos com S $\beta$ -Tal ainda não são bem compreendidos e há controvérsias na literatura. Alguns autores estabelecem que a alfa-talassemia seria um forte modulador para S $\beta$ -Tal (65,81), porém outros estudos não encontraram valor significativo em suas comparações (68,155,175). Alguns estudos tiveram um número limitado de pacientes com S $\beta$ -Tal, o que dificulta fazer uma inferência mais apurada sobre os resultados encontrados. A co-herança de alfa-talassemia não teve influência significativa nos parâmetros hematológicos das crianças com as mutações de maior frequência neste estudo, a IVS-I-1 G>A e a CD 39 C>T. Referente aos dados clínicos, a co-herança de alfa-talassemia também não apresentou valores significativos. Portanto, nessa coorte, a alfa talassemia não foi considerada um modulador da S $\beta$ -Tal. Contudo novos estudos são necessários para compreender a influência da co-herança de alfa talassemia no fenótipo de indivíduos com S $\beta$ -Tal, com maior amostragem, principalmente em relação as mutações com baixa frequência nesse estudo.

A única triplicação de genes alfa observada foi encontrada em um paciente com a mutação -29 Tata box. O favorecimento do desequilíbrio entre as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  podem agravar a doença. Dados de Mikobi e colaboradores (159), demonstraram que os níveis de HbF foram significativamente menores no grupo de pacientes com triplicação. Entretanto, no presente estudo, o nível de HbF observado foi maior em relação as crianças que não apresentaram a triplicação. Mas o número foi muito pequeno para inferências estatísticas.

Em síntese, o presente estudo mostrou que é fundamental a identificação do tipo de mutação do alelo beta talassêmico, em ambos os genótipos  $S\beta^+$ -Tal ou  $S\beta^0$ -Tal, não sendo suficiente somente a caracterização fenotípica, devido a amplas variações clínicas e hematológicas observadas em  $S\beta^+$ -Tal, com variações da produção das cadeias  $\beta$ . Os resultados encontrados corroboram que quanto maior o percentual de HbA residual, menor a gravidade da  $S\beta$ -Tal. Um fator que merece investigação futura é a influência dos níveis de HbF no fenótipo da  $S\beta$ -Tal. No nosso estudo, o maior percentual de HbF em algumas mutações do alelo talassêmico, foi sugestivo para uma menor incidência de eventos clínicos, uma vez que a HbF inibe a polimerização da HbS e sua participação na copolimerização é menor em relação a HbA e de acordo com Steinberg e colaboradores, apenas 10 pg de HbF, seria necessária para reduzir a polimerização da HbS (50).

Como a distribuição das mutações da beta talassemia é heterogênea, a principal dificuldade do estudo foi justamente realizar comparações com os poucos dados existentes na literatura. Em grande parte, os estudos, mesmo internacionais, não avaliaram os parâmetros moduladores investigados nesta casuística. Da mesma forma, muitos estudos também não identificaram as mutações causadoras de beta-talassemia. A baixa frequência de algumas mutações, tanto neste estudo, como em outros, foi um fator limitante para uma avaliação mais apurada dos dados observados. Outros fatores genéticos, além do alelo beta talassêmico, podem estar modulando as características clínicas e hematológicas nesses pacientes, mas tal estudo requer um número ainda maior de pacientes e o uso de outras metodologias para identificação em investigações futuras

## 7 CONCLUSÃO

- A incidência relativa da S $\beta$ -Tal na amostragem, representa cerca de 6% do total de casos com doença falciforme. O subtipo S $\beta^0$ -Tal é um pouco mais frequente que o S $\beta^+$ -Tal.
- Os diferentes alelos beta-talassêmicos são o principal fator modulador das manifestações clínicas e hematológicas da doença falciforme S $\beta$ -talassemia.
- Os parâmetros hematológicos e a incidência de manifestações clínicas são bastante semelhantes nas crianças com os diferentes alelos S $\beta^0$ -Tal. Há, entretanto, algumas características específicas em algumas delas que necessitam de número mais elevado de casos para que se confirmem os achados do presente estudo.
- Na mutação  $\beta$ -Tal IVS-I-5 G>A, presente em seis casos na presente casuística, não há produção de HbA detectável por HPLC. As manifestações clínicas e hematológicas não se distinguem de mutações tipicamente consideradas como causadoras de S $\beta^0$ -Tal.
- Na mutação  $\beta^+$ -Tal IVS-I-110 G>A, presente em oito casos na casuística, a produção de Hb A está presente, mas em pequena quantidade, o que é insuficiente para amenizar o quadro clínico e hematológico, devendo ser considerada, a nosso ver, uma forma grave de S $\beta^+$ -Tal, indistinguível das formas de S $\beta^0$ -Tal.
- Os diversos genótipos de S $\beta^+$ -Tal não podem ser considerados num único grupo quando de análises clínicas e de dados hematológicos. Na presente casuística, foram notadas diferenças muito significativas entre fenótipos "leves" (-101 C>T, -92 C>T, e IVS-II-839 T>C e IVS-II- 844 C>A em *cis*) e "moderados" (IVS-I-6 T>C e -29 A>G). Para as demais mutações encontradas, o número de casos é muito restrito para tentar sua classificação adequada.
- O alelo  $\beta$ -tal, na maioria das vezes, teve origem europeia. Como esperado, vários alelos  $\beta^+$ -Tal, principalmente os localizados na região promotora, tiveram provável origem africana.

- A mutação CD39 C>T, mais incidente na casuística, está de acordo com as observações em outros estudos do Brasil, demonstrando forte associação com o fluxo gênico do alelo  $\beta$ -talassêmico proveniente da Itália.
- AVC foi identificado somente no paciente com a mutação CD39 C>T e o AIT foi observado em uma criança com a mutação IVS-I-I G>A, corrobora com o tipo de genótipo associado, o  $S\beta^0$ -Tal, onde não há produção de HbA.
- Nas mutações IVS-I-5 G>A e IVS-I-110 G>A foi observado pelo DTC, risco condicional baixo para AVC e AIT, demonstrando que genótipos  $S\beta^+$ -Tal, com baixos percentuais de HbA, também são susceptíveis para estas manifestações clínicas.
- A frequência de co-herança de talassemia  $-\alpha^{3.7}$  em  $S\beta$ -Tal, foi inferior à das crianças SS, pois apenas um dos pais (o que tem o alelo  $\beta^S$ ) geralmente proveio de ancestrais africanos, reconhecidamente portadores de prevalência mais elevada do alelo  $-\alpha^{3.7}$  do que a população europeia.
- A co-herança de alfa talassemia não teve influência significativa nos parâmetros hematológicos e clínicos.
- A incidência dos haplótipos  $\beta^S$  corrobora com outros estudos da doença falciforme no estado de Minas Gerais e confirma o mesmo padrão de distribuição dos alelos africanos em nossa população. Os haplótipos CAR e Benin não tiveram diferenças expressivas nos parâmetros hematológicos e na incidência de eventos clínicos.
- O sequenciamento do gene da beta globina é essencial no diagnóstico preciso e na determinação dos genótipos de  $S\beta$ -Tal, principalmente em populações nas quais a diversidade étnica é muito grande.
- A caracterização clínica, hematológica e as bases moleculares dos genótipos  $S\beta$ -Tal é útil para o prognóstico e um manejo terapêutico mais adequado para pacientes com esse subtipo de doença falciforme.

## 8 REFERÊNCIAS

1. Weatherall DJ. Hemoglobinopathies worldwide: present and future. *Curr Mol Med.* 2008;8(7):592–9.
2. Sankaran, VG, Orkin SH. The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(1):1–14.
3. Madigan C, Malik P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies Part I: sickle cell disease Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. *Expert Rev Mol Med.* 2006;8(9):1–23.
4. Sankaran VG and Nathan DG. Reversing the Hemoglobin Switch. *N Engl J Med.* 2010;23(363):2258–60.
5. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: An increasing global health problem. *Bull World Health Organ.* 2001;79(8):704–12.
6. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell Disease. *Lancet.* 2004;364:1343–60.
7. Nagel RL, Fabry ME, Kaul D, Billett H, Croizat H, Labie D, et al. Known and Potential Sources for Epistatic Effects in Sickle Cell Anemia. *Ann N Y Acad Sci.* 1989;565(1):228–38.
8. Rund D, Fucharoen S. Genetic modifiers in hemoglobinopathies. *Curr Mol Med.* 2008;8(7):600–8.
9. Cançado RD doença falciforme no B, Jesus JA. Sickle cell disease in Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007;29(3):204–6.
10. Fernandes APPC, Januário JN, Cangussu CB, Macedo DL De, Viana MB. Mortality of children with sickle cell disease: a population study. *J Pediatr (Rio J).* 2010;86(4):279–84.
11. Naoum PC. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. *Revi Brasi Hematol e Hemoter.* 2000;22(1):5–22.
12. Zago MA, Costa FF, Freitas TC. Clinical, hematological and genetic features of sickle-cell anemia and sickle cell-& thalassemia in a Brazilian population. *Clin Genet.* 1980;18:58–64.
13. Brasil: Brasil 500 anos de povoamento. 2007. Rio de Janeiro, Brazil: IBGE.

14. Felix AA, Souza HM, Ribeiro SBF. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32(3):203–8.
15. Marengo-Rowe AJ. Structure-function relations of human hemoglobins. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 2006;19(3):239–45.
16. Fonseca SF, Moura Neto JP, Goncalves MS. Prevalence and molecular characterization of  $\beta$ -thalassemia in the state of Bahia, Brazil: first identification of mutation HBB: c.135delC in Brazil. *Hemoglobin.* 2013;37(3):285–90.
17. Silveira ZML, Barbosa MV, Fernandes TAAM, Kimura EM, Costa FF SM, Sonati MF, Rebecchi IMM, Medeiros TMD. Characterization of beta-thalassemia mutations in patients from the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Genet Mol Biol.* 2011;34(3):421–4.
18. Silva ANLM, Cardoso GL, Cunha DA, Diniz IG, Santos SEB, Andrade GB, Trindade SMS, Cardoso MSO, Francês LTVM, Guerreiro FJ. The spectrum of  $\beta$ -thalassemia mutations in a population from the Brazilian Amazon. *Hemoglobin.* 2016;40(1):20–4.
19. Araújo AS, Silva LWJ, Leão S a C, Bandeira FCGM, Petrou M, Modell B, Zago MA. A different molecular pattern of beta-thalassemia mutations in northeast Brazil. *Hemoglobin.* 2003;27(4):211–7.
20. Carrocini GCS, Venancio LPR, Pessoa VLR, Lobo CLC, Bonini-Domingos CR. Mutational Profile of Homozygous  $\beta$ -Thalassemia in Rio de Janeiro, Brazil. *Hemoglobin.* 2017;41(1):12–5.
21. Bezerra MAC. Aspectos clínicos , bioquímicos e moleculares das síndromes Talassêmicas em população do estado de Pernambuco. (Dissertação de mestrado). Universidade Estadual de Campinas; 2007.
22. Bonini-Domingos CR. Thalassemia screening in Brazil: results for 20 years. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2004;26(4):288–9.
23. Birgens H, Ljung R. The thalassaemia syndromes. *Scand J Clin Lab Invest.* 2007;67(1):11–25.
24. Schechter AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood.* 2008;112(10):3927–38.

25. Huisman THJ. 1 The structure and function of normal and abnormal haemoglobins. *Baillieres Clin Haematol.* 1993;6(1):1–30.
26. Quinn CT. Sick cell Disease in Childhood. *Pediatr Clin North Am.* 2013;60(6):1363–81.
27. Grosveld F, Dillon N, Higgs D. The regulation of human globin gene expression. *Baillieres Clin Haematol.* 1993;6(1):31–55.
28. Frenette PS, Atweh GF. Science in medicine Sick cell disease : old discoveries , new concepts , and future promise. *J Clin Invest.* 2007;117(4):850–8.
29. Maniatis T, Fritsch EF, Lauer J, Lawn RM. The molecular genetics of human hemoglobins. *Annu Rev Genet.* 1980;14:145–78.
30. Ngo DA, Steinberg MH. Genomic approaches to identifying targets for treating  $\beta$  hemoglobinopathies. *BMC Med Genomics.* 2015;8(1):1–13.
31. Nguyen T. Hemoglobinopathies in the Neonate. *Neoreviews.* 2015;16(5):278–286.
32. Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies. *Scand J Clin Lab Invest.* 2007;67(1):71–86.
33. Kohne E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Dtsch Ärzteblatt Int.* 2011;108(31–32):532–40.
34. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigations of hemoglobinopathies and thalassemia: review and update. *Clin Chem.* 2000;46(8):1284–90.
35. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sick cell disease. *Nat Rev Dis Prim.* 2018;4:1–22.
36. Weatherall DJ, Clegg JB. Thalassemia--a global public health problem. *Nat Med.* 1996;2(8):847–9.
37. Ashley-Koch A, Yang Q OR. Sick Hemoglobin (Hb S) Allele and Sick Cell Disease: A HuGE Review. *Am J Epidemiol.* 2000;150(10):839–45.
38. Bertholo LC, Moreira HW. Amplificação gênica alelo-específica na caracterização das hemoglobinas S, C e D e as interações entre elas e talassemias beta. *J Bras Patol e Med Lab.* 2006;42(4):245–51.
39. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sick-cell disease. *Lancet.* 2010;376(9757):2018–31.

40. Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ.* 2008;86(6):480–7.
41. Odièvre MH et al. Pathophysiological insights in sickle cell disease. *Indian J Med Res.* 2011;134(4):532–537.
42. Brittenham GM, Schechter AN, Constance TN. Hemoglobin Hemolytic. *Blood J.* 1985;65(1):183–9.
43. Bunn HF. Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease. *N Engl J Med.* 1997;337:762–9.
44. Bitoungui VJN, Pule GD, Hanchard N, Ngogang J, Wonkam A. Beta-Globin Gene Haplotypes Among Cameroonians and Review of the Global Distribution: Is There a Case for a Single Sickle Mutation Origin in Africa? *Omi A J Integr Biol J Integr Biol.* 2015;19(3):171–9.
45. Serjeant GR. The Natural History of Sickle Cell Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(10):1–12.
46. Elion J, Berg PE, Lapoumeroulie C, Trabuchet G, Mittelman M, Krishnamoorthy R, Schechter AN, Labie D. DNA sequence variation in a negative control region 5' to the beta-globin gene correlates with the phenotypic expression of the beta S mutation. *Blood.* 2008;3:787–92.
47. Zago MA, Pinto ACS. Fisiopatologia das doenças falciformes : da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007;29(3):207–14.
48. Januario JN. Incidência Da Doença Falciforme Em Um Milhão De Nascidos Vivos Em Minas Gerais (1998-2001). *Cehmob.Org.Br.* 2002.
49. Clark BE, Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. *Clin Lab Haematol.* 2004;26(3):159–76.
50. Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, Ngo D, Baldwin CT, Sebastiani P, Chui DHK, Steinberg MH. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood.* 2011;118(1):19–27.
51. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle Cell Disease. *N Engl J Med.* 2017;376(16):1561–73.
52. Frenette DM and PS. Vaso-Occlusion in sickle cell disease: Pathophysiology and novel targeted therapies. *Blood.* 2013;122(24):3892–8.

53. Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: Inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation*. 2004;11(2):129–51.
54. Thein SL. Genetic modifiers of sickle cell disease. *Hemoglobin*. 2011;35(5–6):589–606.
55. Di Nuzzo DVP FS. Sickle cell disease and infection. *J Pediatr (Rio J)*. 2004;80(5):347–54.
56. Kanavaki I, Makrythanasis P, Lazaropoulou C, Kattamis A, Tzanetea R, Kalotychoy V, Rombos I, Papassotirou I. Adhesion molecules and high-sensitivity C-reactive protein levels in patients with sickle cell beta-thalassaemia. *Eur J Clin Invest*. 2012;42(1):27–33.
57. Rigano P, Pecoraro A, Calvaruso G, Steinberg MH, Iannello S, Maggio A. Cerebrovascular events in sickle cell-beta thalassaemia treated with hydroxyurea: A single center prospective survey in adult Italians. *Am J Hematol*. 2013;88(11):261–4.
58. Ohene-Frempong BK, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, Wethers DL, Pegelow CH, Gill FM. Cerebrovascular Accidents in Sickle Cell Disease: Rates and Risk Factors. *Blood*. 1998;91:288–95.
59. Belisário AR, Nogueira FL, Rodrigues RS, Toledo NE, Cattabriga ALM, Velloso-Rodrigues C, Toledo NE, Cattabriga ALM, Rodrigues CV, Duarte FOC, Silva CM, Viana MB. Association of alpha-thalassaemia, TNF-alpha (-308G>A) and VCAM-1 (c.1238G>C) gene polymorphisms with cerebrovascular disease in a newborn cohort of 411 children with sickle cell anemia. *Blood Cells, Mol Dis*. 2015;54(1):44–50.
60. Brasil M da S. Doença Falciforme. *Conduas básicas para tratamento*. 2012.
61. Azar S, Wong TE. Sickle Cell Disease: A Brief Update. *Med Clin North Am*. 2017;101(2):375–93.
62. Rezende P V., Viana MB, Murao M, Chaves ACL, Ribeiro ACF. Acute splenic sequestration in a cohort of children with sickle cell anemia. *J Pediatr (Rio J)*. 2009;85(2):163–9.

63. Belhani H , Morle G , Godet J , Bachir D , Henni t , Zerhouni F , Bensenouci Um CP. Sickle cell beta-thalassaemia compared with sickle cell anaemia in Algeria. *J Contemp Ethnogr.* 1984;32(4):346–50.
64. Kulozik AE, Bail S, Kar BC, Serjeant BE, Serjeant GE. Sickle cell-(beta)+ thalassaemia in Orissa State. *Br J Haematol.* 1991;77(2):215–20.
65. Mukherjee MB, Nadkarni AH, Gorakshakar AC, Ghosh K, Moranth D, Colah RB. Clinical, hematologic and molecular variability of sickle cell- $\beta$  thalassemia in western India. *Indian J Hum Genet.* 2010;16(3):154.
66. Vincent O, Oluwaseyi B, James B, Saidat L. Coinheritance of  $\beta$ -Thalassemia and Sickle Cell Anaemia in Southwestern Nigeria. *Ethiop J Health Sci.* 2016;26(6):517.
67. Serjeant GR, Serjeant BE, Fraser RA, Hambleton IR, Higgs DR, Kulozik AE, Donaldson A. Hb S- $\beta$ -thalassemia: molecular, hematological and clinical comparisons. *Hemoglobin.* 2011;35(1):1–12.
68. Adekile AD, Akbulut N. The Sickle  $\beta$  -Thalassemia Phenotype. 2017;39(5):1–5.
69. Serjeant GR, Sommereux A, Stevenson M, Mason K, Serjeant BE. Comparison of Sickle Cell- $\beta^0$  Thalassaemia with Homozygous Sickle Cell Disease. *Br J Haematol.* 1979;41(1):83–93.
70. Serjeant GR, Ashcroft MT, Serjeant BE, Milner PF. The Clinical Features of Sickle - Cell/ $\beta$  Thalassaemia in Jamaica. *Br J Haematol.* 1973;24(1):19–30.
71. Thein SL. The molecular basis of b- thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3:241–65.
72. Christakis J, Vavatsi N, Hassapopoulou H, Angeloudi M, Papadopoulou M, Loukopoulos D, Morris JS, Serjant BE, Serjant GR. A comparison of sickle cell syndromes in Northern Greece. *Br J Haematol.* 1991;77(3):386–91.
73. Steinberg, M., Forget, B., Higgs, D., & Weatherall D. *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management.* Cambridge Univ Press. 2009;2 edição(Chapter 23):564–70.
74. Bienzle U, Kappes R, Reimer A, Feldheim M, Tischendorf FW, Kohne E. Sickle cell-beta + -thalassaemia: a haematological and clinical study in Liberia. *Blut.* 1983;47(5):279–85.

75. Thein SL. Genetic modifiers of beta-thalassemia. *Haematol Hematol J*. 2005;90(5):649–60.
76. Day ME, Rodeghier M, Driggers J, Bean CJ, Volanakis EJ, Debaun MR. A significant proportion of children of African descent with HbS $\beta^0$ thalassaemia are inaccurately diagnosed based on phenotypic analyses alone. *Br J Haematol*. 2018;1–4.
77. Stuart H. Orkin, David E. Fisher, David Ginsburg, Samuel E. Lux DGN. *Hematology and oncology of infancy and childhood*. 8th ed. Philadelphia; 2015. 3294 p.
78. Ferraz MHC, Murao M. Diagnóstico laboratorial da doença falciforme em neonatos e após o sexto mês de vida Laboratorial diagnosis of sickle cell disease in the neonate and after the sixth month of life. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29(3):218–22.
79. Figueiredo MS. The compound state: Hb S/beta-thalassemia. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015;37(3):150–2.
80. Thein SL. Molecular basis of  $\beta$  thalassemia and potential therapeutic targets. *Blood Cells, Mol Dis*. 2017;0–1.
81. Atweh GF, Forget BG. Clinical and molecular correlations in the sickle/beta+-thalassemia syndrome. *Am J Hematol*. 1987;24(1):31–6.
82. Koduri PR, Kovarik P. Acute splenic sequestration crisis in an adult with sickle  $\beta$ -thalassemia. *Ann Hematol*. 2006;85(9):633–5.
83. Timerman A, Stefanini E. *Tratado de*. Vol. 1ª Edição. 2013. 5 p.
84. Belisário AR, Sales RR, Viana MB. Very mild forms of Hb S/beta+-thalassemia in Brazilian children. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015;37(3):198–201.
85. Steinberg MH, Dreiling BJ. Clinical, hematologic and biosynthetic studies in sickle cell -  $\beta^0$  - thalassemia: A comparison with sickle cell anemia. *Am J Hematol*. 1976;1(1):35–44.
86. Barrios NJ, Kirkpatrick D V, Lohman D, McMullen CC, Wilson W, Humbert JR. Spleen function in children with sickle  $\beta^+$  thalassemia. *J Natl Med Assoc*. 1991;83(9):819–22.
87. Bashir N, Barkawi M, Sharif L. Sickle cell/beta-thalassemia in North Jordan. *J Trop Pediatr*. 1992;38(4):196–8.

88. Divoky V, Baysal E, Schiliro G, Dibenedetto SP, Huisman TH. A mild type of Hb S-beta (+)-thalassemia [-92(C-->T)] in a Sicilian family. *Am J Hematol.* 1993;42(2):225–6.
89. Boletini E, Svobodova M, Divoky V, Baysal E, Ciirik MA, Dimovskil AJ, Liang R, Adelike AD, Huisman THJ. Sickle cell anemia, sickle cell  $\beta$ -thalassemia, and thalassemia major in Albania: characterization of mutations. *Hum Genet.* 1994;2:182–7.
90. Altay. C, Öner.C, Öner.R, Mesci.L, Balkan.H, Tüzmen. S, Bask. A.N, Gümrük. F G. Genotype-Phenotype Analysis in HbS Beta Thalassemia. *Hum Hered.* 1997;47:161–4.
91. Donaldson a, Old J, Fisher C, Serjeant BE, Serjeant GR. Jamaican Sbeta+-thalassaemia: mutations and haematology. *Br J Haematol.* 2000;108(2):290–4.
92. Loukopoulos D, Voskaridou E, Kalotychou V, Schina M, Loutradi A, Theodoropoulos I. Reduction of the clinical severity of sickle cell/ $\beta$ -thalassemia with hydroxyurea: The experience of a single center in Greece. *Blood Cells, Mol Dis.* 2000;26(5):453–66.
93. Schmugge M, Waye JS, Basran RK, Zurbriggen K, Frischknecht H. The Hb S/ $\beta$ + -thalassemia phenotype demonstrates that the IVS-I (-2) (A>C) mutation is a mild  $\beta$ -thalassemia allele. *Hemoglobin.* 2008;32(3):303–7.
94. Amid, 1 Melina Cheong 1, Barry Eng, 2 Meredith Hanna 2, Betty-Ann Hohenadel 2, Lisa M. Nakamura 2, Lynda Walker 2, Isaac Odame 1, et al. Hb S/b+ -thalassemia due to Hb sickle and a novel deletion of DNase I hypersensitive sites HS3 and HS4 of the b locus control region Sickle. 2015;166–8.
95. Yadav R, Lazarus M, Ghanghoria P, Singh M, Gupta B, Kumar S, Sharma RK, Shanmugam R. Sickle cell disease in Madhya Pradesh , Central India : A comparison of clinical profile of sickle cell homozygote vs . sickle-beta thalassaemia. *Hematology.* 2016;6:11–21.
96. Gasparini NP, Agriello EE, Zanella MJL, Iommi MP. Síndroem drepanocítico asociación de hemoglobina S Y  $\beta$  Talasemia. *Medicina (B Aires).* 2016;76(6):369–72.

97. Benites BD, Bastos SO, Baldanzi G, Santos DO, Ramos CD, Costa FF, Gilli SCO, Saad STO. Sick cell /  $\beta$ -thalassemia: Comparison of  $S\beta^0$  and  $S\beta^+$  Brazilian patients followed at a single institution. *Hematology*. 2016;9:0–7.
98. Di Maggio R, Hsieh MM, Zhao X, Calvaruso G, Rigano P, Renda D, Tisdale JF, Maggio A. Chronic administration of hydroxyurea (HU) benefits caucasian patients with sickle-beta thalassemia. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3):1–9.
99. Dash PM, Sahu PK, Patel S, Mashon RS, Kharat KR, Mukherjee MB. Effect of Assorted Globin Haplotypes and  $\alpha$ -Thalassemia on the Clinical Heterogeneity of Hb S- $\beta$ -Thalassemia. *Hemoglobin*. 2018;0(0):1–7.
100. Zimmerman SA, Schultz WH, Davis JS, Pickens C V., Mortier NA, Howard TA, Ware RE. Sustained long-term hematologic efficacy of hydroxyurea at maximum tolerated dose in children with sickle cell disease. *Blood*. 2004;103(6):2039–45.
101. Anvisa. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes. Vol. 1, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2002. 1–143 p.
102. Adams RJ, Ataga KI, Ballard H, Benjamin L, Billett H, Boehme C, Carine BMS, Cutter GR, Morton G, . The management of sickle cell disease. Vol. 4, National Institutes of Health. 2002. 1–206 p.
103. Giardine B, van Baal S, Kaimakis P, Riemer C, Miller W, Samara M, Kollia P, Anagnou NP, Chui DHK, Wajcman H, Hardison RC, Patrinos GP. HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations: 2007 update. *Hum Mutat*. 2007;28(2):206.
104. Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: Lessons from the thalassaemias. *Nat Rev Genet*. 2001;2(4):245–55.
105. Treisman R, Stuart H, Orkin M. Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned  $\beta$ -thalassaemia genes. *Nature*. 1983;302:591–6.
106. Li J, Plonczynski M, Steinberg MH, Kheradpour A, Alter BP. Severe Hb S- $\beta^+$  thalassemia caused by IVS-I splice site mutations. *Hemoglobin*. 1998;22(4):383–6.
107. Olivieri NF. The  $\beta$ -Thalassemias. *N Engl J Med*. 1999;341(2):99–109.
108. Gomes WR, Santos RA, Cominal JG, Tavares CFF, Gomes WR. Frequencies of CD39, IVS1-1, IVS1-6 and IVS1-110 mutations in beta-thalassemia carriers and their influence on hematimetric indices. *J Bras Patol e Med Lab*. 2017;53(6):362–7.

109. Costa FF, Taveira MH, Zimerman ZM. Molecular basis of beta-thalassemia in Brazil. *Blood*. 1990;76(10):58.
110. Reichert VCD, Castro SM, Wagner SC, Albuquerque DM, Hutz MH, Leistner-Segal S. Identification of  $\beta$  thalassemia mutations in South Brazilians. *Ann Hematol*. 2008;87(5):381–4.
111. Andrade TG, Fattori A, Saad STO, Sonati MF, Costa FF. Molecular identification of Sicilian (deltabeta) degrees-thalassemia associated with beta-thalassemia and hemoglobin S in Brazil. *Brazilian J Med Biol*. 2002;35(8):873–6.
112. Rocha, Lilianne Brito da Silva, Martins MF. Distribuição das mutações da  $\beta$  - talassemia em Fortaleza, Ceará. *J Bras Patol Med Lab*. 2010;46(6):437–41.
113. Fonseca SF, Kerbauy J, Escrivao C, Figueiredo MS, Cancado R, Arruda VR, SS and CF. Genetic analysis of  $\beta$ -Thalassemia major and  $\beta$ -Thalassemia intermedia in Brazil. *Hemoglobin*. 1998;22(3):197–207.
114. Martins C S, Ramalho A S, Sonati M F, Gonçalves M S and CF. Molecular characterisation of a thalassaemia heterozygotes in Brazil. *At. J Med Genet*. 1993;30(9):797–8.
115. Lindenau JD, Wagner SC, de Castro SM, Hutz MH. The effects of old and recent migration waves in the distribution of HBB\*S globin gene haplotypes. *Genet Mol Biol*. 2016;39(4):515–23.
116. Pagnier J, Mears JG, Dunda-Belkhouja O, Schaefer-Rego KE, Beldjord C, Nagel RL, Labie D. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(6):1771–3.
117. Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Williams TN, Weatherall DJ, Hay SI. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat Commun*. 2010;1(8).
118. Nagel R. The origin of the hemoglobin S gene: clinical genetic and anthropological consequences. *Einstein Q J Biol Med*. 1987;2:53–62.

119. Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase Chain Reaction Amplification Applied to the Determination of  $\beta$ -like Globin Gene Cluster Haplotypes. 1989;69(1989):66–9.
120. Orkin SH, Kazazian Jr. HH, Antonarakis SE, Goff SC, Boehm CD, Sexton JP, Waber PG, Giardina PJV. Linkage of  $\beta$ -thalassaemia mutations and  $\beta$ -globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human  $\beta$ -globin gene cluster. *Nature*. 1982;296:627–31.
121. Muralitharan S, Krishnamoorthy R, Nagel RL.  $\beta$ -Globin-like Gene Cluster Haplotypes in Hemoglobinopathies. In: *Hemoglobin Disorders: Molecular Methods and Protocols* Edited. 2003. p. 195–211.
122. Samarah F, Athanasiou-Metaxa M, Vavatsi-Christaki N. Genetic modulators of sickle cell disease. *Aristotle Univ Med J*. 2007;34(2):25–35.
123. Hanchard N, Elzein A, Trafford C, Rockett K, Pinder M, Jallow M, Harding Rosalind, Kwiatkowski D, McKenzie C. Classical sickle beta-globin haplotypes exhibit a high degree of long-range haplotype similarity in African and Afro-Caribbean populations. *Bio Med Cent*. 2007;8(52):1–11.
124. Neto GCG, Pitombeira MS. Molecular aspects for sickle cell anemia. *J Bras Patol e Med Lab*. 2003;39(1):51–6.
125. Neto GCG, Pitombeira MS, Vieira HF, Vieira MLC FD. Análise dos haplótipos do gene da betaS-globina no Ceará. *J Bras Patol e Med Lab*. 2005;41:315–21.
126. Liu L, Muralidhar S, Singh M, Sylvan C, Kalra IS, Quinn CT, Onyekwere OC and PB. High-Density SNP Genotyping to Define  $\beta$ -Globin Locus Haplotypes. *Blood Cells Mol Dis*. 2009;42(1):16–24.
127. Zago MA, Figueiredo MS, Ogo SH. Bantu  $\beta$ s cluster haplotype predominates among Brazilian Blacks. *Am J Phys Anthropol*. 1992;88(3):295–8.
128. Calvo-González E. On slaves and genes: “origins” and “processes” in genetic studies of the Brazilian population. In: *Historia, ciências, saude--Manguinhos*. 2014.p. 1113–29.
129. Watanabe AM, Pianovski MAD, Lenzi L, Cat R. The frequency of  $\beta$  S -globin haplotypes in the state of Paraná, Brazil, and clinical manifestations of sickle cell anemia. *J Bras Patol e Med Lab*. 2017;53(1):24–30.

130. Fleury M. Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: Aspectos clínicos e laboratoriais. *Rbac*. 2007;39(2):89–93.
131. Rahimi Z, Muniz A, Akramipour R, Tofieghzadeh F, Mozafari H, Vaisi-Raygani A, et al. Haplotype analysis of beta thalassemia patients in Western Iran. *Blood Cells, Mol Dis*. 2009;42(2):140–3.
132. Cherry L, Calo C, Talmaci R, Perrin P, Gavrila L.  $\beta$  -Thalassemia Haplotypes in Romania in the Context of Genetic Mixing in the Mediterranean Area. *Hemoglobin*. 2016;40(2):85–96.
133. Bilgen T, Arikan Y, Canatan D, Yeşilipek A, Keser I. The association between intragenic SNP haplotypes and mutations of the beta globin gene in a Turkish population. *Blood Cells, Mol Dis*. 2011;46(3):226–9.
134. Kazazian HH, Orkin SH, Markham AF CH and WP. Quantification of the close association between DNA haplotypes and specific  $\beta$ -thalassaemia mutations in Mediterraneans. *Nature*. 1984;310:152–4.
135. Antonarakis SE, Kazazian HH OS. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Hum Genet*. 1985;70(1):95–9.
136. Bibi A, Messaoud T, Fattoum S. Haplotypes linked to three rare  $\beta$ -thalassemia mutations, originally reported in Tunisia. *Hemoglobin*. 2006;30(2):175–81.
137. Yuthavong Y, Wilairat P. Protection against malaria by thalassaemia and haemoglobin variants. *Parasitol Today*. 1993;9(7):241–5.
138. Galanello R, Cao A. Alpha-thalassemia. *Genet Med*. 2011;13(2):83–8.
139. De Mare A, Groeneger AHO, Schuurman S, Van Den Bergh FATJM SJ. A rapid single-tube multiplex polymerase chain reaction assay for the seven most prevalent  $\alpha$ -thalassemia deletions and  $\alpha\alpha\alpha$ anti 3.7 $\alpha$ -globin gene triplication. *Hemoglobin*. 2010;34(2):184–90.
140. Gu X, Zeng Y. A review of the molecular diagnosis of thalassemia. *Hematology*. 2002;7(4):203–9.
141. Piel FB, Weatherall DJ. The  $\alpha$ -Thalasseмииs. *N Engl J Med*. 2014;371(20):1908–16.

142. Ballas SK. Effect of alpha-globin genotype on the pathophysiology of sickle cell disease. *Pediatr Pathol Mol Med*. 2001;20(2):107–21.
143. Vyas P, Higgs DR, Weatherall DJ, Dunn D, Serjeant BE, Serjeant GR. The interaction of alpha thalassaemia and sickle cell-beta<sup>o</sup> thalassaemia. *Br J Haematol*. 1988;70(4):449–54.
144. Gonzalez - Redondo JM, Kutlar A, Kutlar F, McKie VC, McKie KM, Baysal E, Huisman THJ . Molecular characterization of Hb S(C)  $\beta$  - thalassaemia in American blacks. *Am J Hematol*. 1991;38(1):9–14.
145. Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5(1):13.
146. Pandey SK, Pandey S, Ranjan R, Shah V, Mishra RM, Sharma M, Renu S. Phenotypic Effect of  $\alpha$ -Globin Gene Numbers on Indian Sickle  $\beta$ -Thalassaemia Patients. *J Clin Lab Anal*. 2014;28(2):110–3.
147. Saraf SL, Molokie RE, Nouraie M, Sable CA, Luchtman- L. Differences in the clinical and genotypic presentation of sickle cell disease around the world. *Paediatr Respir Rev*. 2014;15(1):4–12.
148. Embury SH. The Interaction of Coexistent  $\alpha$  - Thalassaemia and Sickle Cell Anemia: A Model for the Clinical and Cellular Results of Diminished Polymerization? *Ann N Y Acad Sci*. 1985;445(1):37–44.
149. Serjeant BE, Mason KP, Kenny MW, Stuart J, Higgs DR, Weatherall DJ, Hayes RJ, Serjeant GR. Effect of alpha thalassaemia on the rheology of homozygous sickle cell disease. *Br J Haematol*. 1983;55(3):479–86.
150. Embury SH. Alpha Thalassaemia a modifier of Sickle-Cell Disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1989;565:213–21.
151. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev*. 2007;21(1):37–47.
152. Rumaney MB, Ngo Bitoungui VJ, Vorster AA, Ramesar R, Kengne AP, Ngogang J, Wonkam A. The co-inheritance of alpha-thalassaemia and sickle cell anemia is associated with better hematological indices and lower consultations rate in Cameroonian patients and could improve their survival. *PLoS One*. 2014;9(6):1–10.

153. Quadri MI, Islam SIAM, Nasserullah Z. The effect of  $\alpha$  -thalassemia on cord blood red cell indices and interaction with sickle cell gene. *Ann Saudi Med.* 2000;20(5–6):367–70.
154. Noguchi CT, Dover GJ, Rodgers GP, Serjeant GR, Antonarakis SE, Anagnou NP, Higgs DR, Weatherall DJ, Schechter AN. Alpha thalassemia changes erythrocyte heterogeneity in sickle cell disease. *J Clin Invest.* 1985;75(5):1632–7.
155. Romana M, Kéclard A, Berchel C MG. Spectrum of  $\beta$ -Thalassemia Mutations in Guadeloupe (French West Indies) and Interactions with Other Hemoglobinopathies. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;30(850):423–5.
156. Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Vrettou C, Maragoudaki E, Michael T, Metaxotou-Mavromati A, Kattamis C. The triplicated alpha-globin gene locus in beta-thalassaemia heterozygotes: clinical, haematological, biosynthetic and molecular studies. *Br J Haematol.* 1996;95(3):467–71.
157. Kimura EM, Grignoli CRE, Pinheiro VRP, Costa FF, Sonati MF. Thalassemia intermedia as a result of heterozygosis for  $\beta^0$  -thalassemia and  $\alpha\alpha\alpha$  anti 3.7/  $\alpha\alpha$  genotype in a Brazilian patient. *Brazilian J Med Biol Res.* 2003;36(3):699–701.
158. Constanço C, Rocha P, Bento C, Silva HM. Talassemia  $\beta$ - heterozigotica com triplicação do gene  $\alpha$  globínico. *Acta Med Port.* 2011;24(4):633–6.
159. Mikobi TM, Lukusa PT, Aloni MN, Lumaka A, Zalagile P, Koenraad A, Gert M, Muamba JMM, Race V. Association between sickle cell anemia and alpha thalassemia reveals a high prevalence of the  $\alpha^{3.7}$  triplication in congolese patients than in worldwide series. *J Clin Lab Anal.* 2017;32(November 2016):1–6.
160. Belisário AR. Avaliação da influência de marcadores genéticos , laboratoriais e clínicos na ocorrência de doença cerebrovascular em crianças com anemia falciforme triadas pelo programa de triagem neonatal de Minas Gerais e acompanhadas no Hemocentro de Belo Horizonte (tese de doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais; 2015.
161. Adams RJ, McKie VC, Brambilla D, Carl E, Gallagher D, Nichols FT, Roach S, Abboud M, Berman B, Driscoll C, Files B, Hsu L, Hurllet A, Miller S, Nancy O, Pegelow C, Scher C, Vichinsky E, Wang W, Woods G, Kutlar A, Wright E, Hagner

- S, Tighe F, Lewin J, Cure J, Zimmerman RA, Waclawiw MA. Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia. *Control Clin Trials*. 1998;19(1):110–29.
162. Faustino P, Pacheco P, Loureiro P, Nogueira PJ, Lavinha J. The geographic pattern of  $\beta$ -thalassaemia mutations in the Portuguese population. *Br J Haematol*. 1999;107(4):903–4.
163. Belisário AR, Martins ML, Brito AMS, Rodrigues CV, Silva CM, Viana MB.  $\beta$ -Globin gene cluster haplotypes in a cohort of 221 children with sickle cell anemia or S $\beta$ -thalassemia and their association with clinical and hematological features. *Acta Haematol*. 2010;124(3):162–70.
164. Rezende, Paulo V, Belisário AR, Oliveira ÉL, Almeida JA, Oliveira LMM, Muniz MBSR, Viana MB. Co-inheritance of alpha thalassemia dramatically decreases the risk of acute splenic sequestration in a large cohort of newborns with hemoglobin SC. *Haematologica*. 2019;104(5).
165. Donaldson A, Old J, Fisher C, Serjeant BE, Serjeant GR. Jamaican S $\beta$ +thalassaemia: Mutations and haematology. *Br J Haematol*. 2000;108(2):290–4.
166. Agouti I, Badens C, Abouyoub A, Levy N, Bennani M. Molecular Basis of  $\beta$ -Thalassemia in Morocco: Possible Origins of the Molecular Heterogeneity. *Genet Test*. 2008;12(4):563–8.
167. Murad H, Moassas F, Ghoury I, Mukhalalaty Y. Haplotype Analysis of Three Common  $\beta$  -Thalassemia Mutations in Syrian Patients Haplotype Analysis of Three Common  $\beta$  -Thalassemia Mutations in Syrian Patients. *Hemoglobin*. 2019;0(0):1–4.
168. Kulozik AE, Yarwood N JR. The Corfu  $\delta\beta^0$  thalassemia: A small deletion acts at a distance to selectively abolish  $\beta$  globin gene expression. *Blood*. 1988;71(2):457–62.
169. Chakalova L, Osborne CS, Dai YF, Goyenechea B, Mavromati AM, Kattamis A, Kattamis C, Fraser P. The Corfu  $\delta\beta^0$  thalassemia deletion disrupts  $\gamma$ -globin gene silencing and reveals post-transcriptional regulation of HbF expression. *Blood*. 2005;105(5):2154–61.
170. Serjeant GR, Serjeant BE, Mason KP, Happich M, Kulozik AE.  $\beta$ -Thalassemia Mutations in Jamaica: Geographic Variation in Small Communities. *Hemoglobin*. 2019;42(5):294–6.

171. Bravo-urquiola M, Arends A, Gómez G, Montilla S, Gerard N, Chacin M, Berbar T, García O, García G, Velasquez D, Castillo O, Krishnamoorthy R. Molecular spectrum of  $\beta$  -thalassemia mutations in the admixed venezuelan population, and their linkage to  $\beta$  -globin gene haplotypes. *Hemoglobin*. 2012;36:209–18.
172. Aslan D. Silent  $\beta$  -thalassemia mutation ( promoter nt-101 C > T ) with increased hemoglobin A 2. *Turk J Pediatr*. 2016;58(3):305–8.
173. Gonzalez-Redondo JM, Stoming TA, Kutlar A, Kutlar F, Lacos KD, Howar YJF, Askoy M, Altay Ç, Gurgey A, Basak AN, Efremov GD, Pekov G HT. A C T substitution at nt--101 in a conserved DNA sequence of the promotor region of the beta-globin gene is associated with “silent” beta-thalassemia. *Blood*. 1989;1(73):1705–11.
174. Garewal G, Das R, Ahluwalia J, Marwaha RK, Varma S. Nucleotide - 88 ( C-T ) Promoter Mutation is a Common  $\beta$  -Thalassemia Mutation in the Jat Sikhs of Punjab , India. *Am J Hematol*. 2005;79:252–6.
175. Steinberg MH, Coleman MB, Adams JG, Rosenstock W. Interaction between HbS- $\beta^0$ -thalassemia and  $\alpha$ -thalassemia. Vol. 288, *American Journal of the Medical Sciences*. 1984. p. 195–9.

## 9 ANEXOS

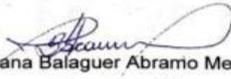
### 9.1 Anexo 1: Comprovante de Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas

 **FUNDAÇÃO  
HEMOMINAS** COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DECLARAÇÃO

Belo Horizonte, 02 de abril de 2019.

Declaro que o projeto de pesquisa "**Estudo de incidência e história natural da doença falciforme do subtipo SBeta-talassemia em coorte de crianças triadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais e acompanhadas na Fundação Hemominas**" (CAAE 56282216.0.0000.5118), coordenado pelo pesquisador Dr. André Rolim Belisário, foi **APROVADO** em 07/07/2016 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas.

  
Tatiana Balaguer Abramo Mendes  
Coordenação do Comitê de Ética em Pesquisa  
Fundação Hemominas

Comitê de Ética em Pesquisa  
FUNDAÇÃO HEMOMINAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
Alameda Ezequiel Dias, 321 – Santa Efigênia – Belo Horizonte – MG – CEP 30130-110  
e-mail: cep@hemominas.mg.gov.br – Tel: 3768-4587

## 9.2 Anexo 2 : Termo de consentimento livre e esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Conselho Nacional de Saúde, Resolução 466/12

**Título da Pesquisa:** Estudo de incidência e história natural da doença falciforme do subtipo SBeta-talassemia em coorte de crianças triadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais e acompanhadas na Fundação Hemominas

As doenças falciformes são enfermidades do sangue causadas pela alteração na forma dos glóbulos vermelhos (hemácias), que ficam parecidas com foice, ao invés de ter a forma normal arredondada. Ela é uma doença genética, ou seja, o pai e a mãe transmitem para os filhos a alteração molecular que causa a doença. A doença acontece por um defeito na hemoglobina, que é a parte do glóbulo vermelho responsável por carregar o oxigênio dos pulmões para o restante do corpo. Dentre as doenças falciformes estudaremos a S $\beta$ -Talassemia, ou seja, a herança da hemoglobina S juntamente com a  $\beta$ -Talassemia. A S $\beta$ -Talassemia causa diferentes sintomas nos pacientes. Alguns casos são mais leves e outros, mais graves. A gravidade da doença depende de fatores ambientais e características genéticas dos indivíduos. Dentre elas, destaca-se alteração molecular que causa a  $\beta$ -Talassemia. Quando essa alteração causa a completa inativação do gene beta, a doença falciforme resultante é conhecida como S $\beta^0$ -Talassemia e a apresentação clínica tende a mais grave. Entretanto, quando o defeito genético causa a diminuição da produção do gene beta, a doença falciforme resultante é conhecida como S $\beta^+$ -Talassemia, caracterizada por uma ampla variação de gravidade clínica que depende do nível de comprometimento da produção de cadeias beta. Nosso objetivo é descrever o perfil das manifestações clínicas, hematológicas e genéticas em crianças com S $\beta$ -Talassemia no estado de Minas Gerais. As crianças serão beneficiadas diretamente porque a pesquisa busca conhecer melhor como a doença se manifesta no paciente, para que o médico tenha condições de realizar ações mais adequadas de tratamento e prevenção de complicações.

Ao concordar com a participação na pesquisa, você estará autorizando que os pesquisadores consultem os dados clínicos e laboratoriais de seu filho ou da criança pela qual você é responsável nos prontuários médicos. Caso você autorize, você não terá nenhum custo. Iremos colher 5 ml de sangue da veia da criança no dia da consulta agendada na Fundação Hemominas para realizar exames genéticos que podem ajudar o médico a conhecer quais os pacientes terão maior risco de ter uma doença mais grave, e assim orientá-lo no tratamento mais adequado para evitar as possíveis complicações. A coleta de sangue será feita por um profissional treinado, mas em alguns casos pode ocorrer um hematoma (cor roxa) na região do braço onde a agulha foi introduzida. Caso seja feita uma coleta de sangue para exames referentes ao acompanhamento clínico, o que ocorre comumente, a amostra poderá ser usada para nossa pesquisa, sem necessidade de nova coleta. Os dados e o material coletado ficarão guardados na Fundação Hemominas. Você poderá se recusar a participar ou solicitar desligamento do projeto de pesquisa, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem nenhum prejuízo ao cuidado de seu filho em seu atendimento e acompanhamento ambulatorial e laboratorial na Fundação Hemominas. Você não receberá remuneração por participar do estudo. Na divulgação dos resultados, o nome da pessoa não será mostrado, garantindo sigilo e privacidade. Você receberá uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido. Além disso, o

participante da pesquisa terá direito a indenização em caso de eventual dano sofrido em razão da pesquisa.

Caso você autorize, o material genético (DNA) recolhido para este estudo poderá ser usado pelos mesmos pesquisadores envolvidos nestas pesquisas em futuras investigações com objetivos semelhantes. Nesse caso, a amostra da criança será conservada por um prazo máximo de dez anos. Durante todo o tempo de armazenamento, você tem o direito de conhecer os resultados obtidos nas pesquisas, além de poder retirar a autorização de armazenamento. Para isso, basta entrar em contato com os pesquisadores nos telefones fornecidos abaixo. Após o prazo máximo de dez anos ou até antes se os pesquisadores julgarem necessário, o material armazenado será descartado. Você pode negar a permissão para o uso da amostra em estudos futuros, e ainda participar deste projeto. Se você autorizar o uso futuro da amostra da criança, qualquer novo estudo utilizando essa amostra deverá ser avaliado e autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação. Qualquer dúvida que você tiver, fale com Marcos Borato Viana, no telefone 3409-9772, ou com André Rolim Belisário, no telefone 3268-0548, nos horários de 8:00 às 17:00h. Você também poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas (Alameda Ezequiel Dias, 321, Santa Efigênia, Belo Horizonte, telefone 37684587).

#### CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, \_\_\_\_\_ abaixo assinado, declaro que após ter sido convenientemente esclarecido sobre a pesquisa "Estudo de incidência e história natural da doença falciforme do subtipo SBeta-talassemia em coorte de crianças triadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais e acompanhadas na Fundação Hemominas", consinto em participar na qualidade de responsável pela criança \_\_\_\_\_, até que eu decida em contrário.

Quanto ao armazenamento de amostras, marque com um X no quadrado abaixo sua decisão:

- Estou ciente das condições de armazenamento e aceito que os pesquisadores guardem a amostra coletada para uso em estudos futuros.
- NÃO aceito que os pesquisadores guardem a amostra coletada para uso em estudos futuros.

Assinatura do responsável: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

Local e data: Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

Pesquisadores responsáveis: André Rolim Belisário, Célia Maria Silva, Marcos Borato Viana, Paulo do Val Rezende, Cibele Velloso Rodrigues, Érica Louback de Oliveira, Rahyssa Rodrigues Sales.

### 9.3 Anexo 3: Termo de assentimento livre esclarecido

*Página 1 de 2*

#### **TERMO DE ASSENTIMENTO**

Conselho Nacional de Saúde, Resolução 466/12

**Título da Pesquisa:** Estudo de incidência e história natural da doença falciforme do subtipo SBeta-talassemia em coorte de crianças triadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais e acompanhadas na Fundação Hemominas

Você está sendo convidado para participar de um projeto de pesquisa. Seus pais já permitiram sua participação. Participarão desta pesquisa crianças e adolescentes com doença falciforme. A doença falciforme é uma doença do sangue que provoca muitos “incômodos”, como você já deve saber. Existem tipos diferentes de doença falciforme e neste projeto iremos estudar a S $\beta$ -Talassemia. A S $\beta$ -Talassemia causa diferentes “incômodos” nos pacientes. Algumas pessoas têm “incômodos” mais leves e outras, mais graves. A gravidade dos “incômodos” depende de várias coisas, incluindo o local onde a pessoa mora, o que ela come, se segue as orientações do médico, além de características do DNA. O DNA é muito importante para nós, pois possui a receita utilizada para formar todo o nosso corpo. Nosso objetivo é descrever o perfil dos “incômodos”, características do sangue e características do DNA em crianças com S $\beta$ -Talassemia no estado de Minas Gerais.

Nós estamos pedindo sua permissão para utilizar um pouco do seu sangue nesta investigação. Daremos preferência para utilizar a amostra de sangue coletada para exames de rotina, ou seja, o sangue que você coleta para fazer os exames que o seu médico solicita. Se não for possível, iremos colher um pouco do seu sangue. A coleta de sangue será feita por uma pessoa treinada, mas em alguns casos pode causar uma coloração roxa no braço. Usaremos a amostra de sangue para realizar testes que podem ajudar o médico a conhecer quais os pacientes terão maior risco de ter uma doença mais grave, e assim ajudar no tratamento mais adequado para evitar as possíveis complicações. Será necessário também coletar alguns dados no seu prontuário, como, por exemplo, resultados de exames de sangue e informações de quando você teve os “incômodos” da doença. Os dados e o material coletado ficarão guardados na Fundação Hemominas. Na divulgação dos resultados, o seu nome não será mostrado. Você não receberá dinheiro pela participação na pesquisa. Também é importante esclarecer que você tem toda a liberdade para decidir se quer ou não autorizar sua participação nesta pesquisa. Se você não autorizar, você não será prejudicado no atendimento. Você pode sair da pesquisa mesmo tendo dado a sua autorização para participação sem nenhuma penalização. Você receberá uma via deste termo de assentimento. Além disso, você terá direito a indenização em caso de eventual dano sofrido em razão da pesquisa.

Caso você autorize, o DNA colhido para este estudo poderá ser usado pelos mesmos pesquisadores envolvidos nestas pesquisas em outras pesquisas com objetivos semelhantes: investigar quais as receitas presentes no DNA são capazes de fazer com que os “incômodos” da doença falciforme sejam mais ou menos graves. Neste caso, a amostra será guardada por um prazo máximo de dez anos. Durante todo o tempo que a amostra ficar guardada, você tem o direito de conhecer os resultados obtidos nas pesquisas, além de poder retirar a autorização de armazenamento. Para isso, basta entrar em contato com os pesquisadores nos telefones fornecidos abaixo. Após o prazo máximo de dez anos ou até antes se os pesquisadores julgarem necessário, o material armazenado será descartado. Você pode negar a permissão para o uso da amostra em outros estudos e ainda assim participar deste projeto. Se você autorizar o uso da amostra em outros estudos, qualquer novo estudo utilizando esta amostra deverá ser avaliado e autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas. Qualquer dúvida que você tiver, fale com Marcos

*Página 2 de 2*

Borato Viana, no telefone 3409-9772, ou com André Rolim Belisário, no telefone 3268-0548, nos horários de 8:00 às 17:00h. Você também poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas (Alameda Ezequiel Dias, 321, Santa Efigênia, Belo Horizonte, telefone 37684587).

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que após ter sido convenientemente esclarecido sobre a pesquisa “Estudo de incidência e história natural da doença falciforme do subtipo SBeta-talassemia em coorte de crianças triadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais e acompanhadas na Fundação Hemominas”, dou anuência para minha participação na pesquisa, até que eu decida em contrário.

Quanto ao armazenamento de amostras, marque com um X no quadrado abaixo sua decisão:

- Estou ciente das condições de armazenamento e aceito que os pesquisadores guardem a amostra coletada para uso em estudos futuros.
- NÃO aceito que os pesquisadores guardem a amostra coletada para uso em estudos futuros.

Assinatura do menor de 18 anos: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

Local e data: Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

Pesquisadores responsáveis: André Rolim Belisário, Célia Maria Silva, Marcos Borato Viana, Paulo do Val Rezende, Cibele Velloso Rodrigues, Érica Louback de Oliveira, Rahyssa Rodrigues Sales.