



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Marcos Isaac Esquenazi

Sequenciamento genético e pesquisa de α -talassemia das hemoglobinas variantes de comportamento físico-químico semelhante ao da hemoglobina S (*S-like*) em crianças do Programa Nacional de Triagem Neonatal do estado do Rio de Janeiro.

Rio de Janeiro
2017

Marcos Isaac Esquenazi

Sequenciamento genético e pesquisa de α -talassemia das hemoglobinas variantes de comportamento físico-químico semelhante ao da hemoglobina S (*S-like*) em crianças do Programa Nacional de Triagem Neonatal do estado do Rio de Janeiro.

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre, ao programa de Mestrado Profissional em Medicina Laboratorial Tecnologia Forense, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Murillo Neufeld

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

E77 Esquenazi, Marcos Isaac.

Sequenciamento genético e pesquisa de α -talassemia das hemoglobinas variantes de comportamento físico-químico semelhante ao da hemoglobina S (S-like) em crianças do Programa Nacional de Triagem Neonatal do Estado do Rio de Janeiro (PNTN-RJ)/ Mascos Isaac Esquenazi. – 20017.

77 f.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Murillo Neufeld

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense.

1. Hemoglobina - Teses. 2. Hemoglobinopatias – Teses. 3. Recém-nascidos – Teses. 4. Talassemia – Teses. 5. Hemoglobinas variantes. I. Neufeld, Paulo Murillo. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.1

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira – CRB-7 5302

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Marcos Isaac Esquenazi

Sequenciamento genético e pesquisa de α -talassemia das hemoglobinas variantes de comportamento físico-químico semelhante ao da hemoglobina S (*S-like*) em crianças do Programa Nacional de Triagem Neonatal do estado do Rio de Janeiro.

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre, ao programa de Mestrado Profissional em Medicina Laboratorial Tecnologia Forense, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 18 de outubro de 2017.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Murillo Neufeld (Orientador)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Marcos Kneip Fleury
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr. Isaac Lima da Silva Filho
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

Rio de Janeiro

2017

DEDICATÓRIA

Aos meus avós Nivaldo e Lódia, minha esposa Tatiana e aos meus filhos
Maria Clara e Guilherme por serem minha fortaleza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente por me permitir chegar até aqui com saúde, bem mais precioso do ser humano. Agradeço também por me dar forças nos momentos mais difíceis e colocar no meu caminho pessoas iluminadas que sem elas não seria possível a realização desse trabalho.

Aos meus avós Nivaldo e Lódia que me tornaram o que sou hoje e a melhor educação que poderia ter recebido.

À minha esposa Tatiana que soube compreender a importância desse trabalho para minha vida profissional. Agradeço por cuidar com tanto carinho dos nossos filhos, mesmo com seus dias repletos de trabalho. Sem você nada disso seria possível. “Amor para a vida toda”!

Aos meus filhos Maria Clara e Guilherme com seu mundo azul, obrigado por entenderem cada um do seu jeito, a minha ausência. A cada retorno para nossa casa, minhas forças se renovavam. Espero que eu possa servir de exemplo para a vida profissional e pessoal de vocês.

À minha mãe Naila pelo cuidado, carinho e preocupação sempre que estou em sua casa, servindo de porto seguro para as “idas e vindas” no RJ.

À minha sogra Edith pelas orações e estímulo incansável aos estudos. Agradeço à toda família pelas palavras de incentivo.

Aos pais dos pacientes, muito obrigado por permitirem a participação das suas crianças no estudo.

Ao professor Paulo Murillo Neufeld, orientador, ex-professor da graduação, amigo e exemplo profissional, obrigado pela confiança e por me aceitar como aluno no programa de mestrado.

Ao professor Marcos Kneip Fleury com sua simplicidade mesmo como referência profissional, ex-professor da graduação, meu amigo, obrigado pela oportunidade de abrir as portas do LACFAR, me dar a chance de aprender um pouco mais e permitir que o projeto acontecesse. Serei sempre grato aos seus ensinamentos.

Ao Isaac Filho pela sua generosidade e disponibilidade sempre que solicitado para tirar nossas dúvidas do trabalho.

À Patricia Siqueira pela sua amizade, por me apresentar inicialmente as técnicas moleculares da PCR e todo seu conhecimento sobre a alfa talassemia.

À Andrea Cony Cavalcanti por transmitir sua serenidade nos momentos turbulentos, ajudar na seleção de amostras e poder aprender sobre a interpretação das hemoglobinopatias pela técnica de HPLC na triagem neonatal. A todos do laboratório de triagem neonatal do Hemorio e a Marcia, assistente social do programa, muito obrigado.

À Major Tatiana Nogueira por me ensinar sobre as técnicas de sequenciamento genético e ter me recebido tão bem no laboratório de genética do IBEx, por me enviar cada artigo novo que encontrava a respeito do nosso trabalho e também trocar experiências sobre os filhos. “Permissão Major”... Obrigado de verdade Tati! Aos amigos Tenente Valentin, Olívia e Ludmila sou muito grato pelo incentivo, acolhimento, auxílio no trabalho e muitas risadas! Ludmila, obrigado também pela disponibilidade na revisão do *abstract*.

À Mayara Alves, estagiária do laboratório de genética por ter trabalhado arduamente no projeto, como uma profissional, incansável nos processos que envolviam nossos sequenciamentos, obrigado pela sua parceria. Sucesso para sua carreira!

Aos meus amigos do INCa pelas palavras positivas, pelas coberturas em dias de aula e outros compromissos ao longo dessa caminhada, principalmente meus parceiros de plantão Marcos Motta, Rachel Brochado, Priscila Dantas e Cristiane Pinheiro, sem a ajuda de vocês não teria chegado aqui.

Aos colegas do LACFAR, Luzinete, Ana Beatriz, pelo carinho e receptividade. Fernanda muito obrigado pelo auxílio na execução das amostras no HPLC. É um prazer sempre estar onde comecei minha escolha profissional!

À Dr^a. Patrícia Moura coordenadora do PNTN-RJ no Hemorio pela disponibilidade em todo o processo da pesquisa no instituto.

A todos envolvidos direta ou indiretamente serei sempre grato!

RESUMO

ESQUENAZI, Marcos Isaac. *Sequenciamento genético e pesquisa de α -talassemia das hemoglobinas variantes de comportamento físico-químico semelhante ao da hemoglobina S (S-like) em crianças do Programa Nacional de Triagem Neonatal do estado do Rio de Janeiro (PNTN-RJ)*. 2017. 77 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

O Brasil se caracteriza por possuir uma composição genética singular, resultado de um processo de miscigenação intenso ao longo da história. As alterações genéticas como resultado deste processo, podem acarretar doenças como as hemoglobinopatias. Algumas hemoglobinas variantes possuem comportamento físico-químico similares ao da Hb S e são denominadas de *S-like*. Essas moléculas podem levar ao falso diagnóstico de doença ou traço falciforme e normalmente são assintomáticas, porém quando em associação com outras hemoglobinopatias e talassemias podem apresentar alterações hematológicas importantes e quadros clínicos mais graves. O objetivo do estudo foi identificar, por sequenciamento genético, hemoglobinas *S-like* do PNTN-RJ e verificar a associação dessas variantes com a talassemia alfa. Foram selecionadas 17 amostras de sangue de recém-nascidos, no período de 22 de outubro de 2016 a 01 de fevereiro de 2017, que apresentaram na sua investigação para hemoglobinopatias, hemoglobinas variantes em *S-Window*, pela metodologia cromatografia líquida de alta performance (HPLC) - ULTRA 2™ com o kit *Ultra Screening Genesys (Trinity Biotech, Jamestown, NY)*. Para verificar a presença da talassemia alfa foi realizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Também foram realizados os sequenciamentos das cadeias alfa (HBA) e beta globina (HBB) da hemoglobina. A técnica de HPLC - *VARIANT®* com o kit *β -Thalassemia Short (Bio-Rad, Califórnia, EUA)*, foi realizada para reavaliar o perfil das hemoglobinas apresentando cromatogramas característicos de Hb Stanleyville II em 4 amostras, 5 de Hb D-Punjab, 5 de Hb Korle-Bu, 1 de Hb Constant Spring e 2 variantes indefinidas. No estudo molecular para talassemia alfa 8 amostras (47,05%), possuíam a deleção do tipo $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$. O sequenciamento do gene alfa realizado em 3 amostras revelou a presença de Hb Stanleyville II, todavia com a mutação presente no gene híbrido $-\alpha^{3.7}$, diferente da maioria dos casos descritos na literatura. No gene da beta globina foram encontrados polimorfismos que se repetiram nas três amostras, sendo um no primeiro éxon e dois no segundo íntron. Concluindo as Hb's Stanleyville II, D-Punjab e Korle-Bu, embora não frequentes no estado do Rio de Janeiro, não são incomuns no estudo. A associação entre $-\alpha^{3.7}$ e as variantes *S-like* encontradas na pesquisa, é frequente. O estudo dos genes HBB e da HBA pela metodologia de sequenciamento é necessário para identificar novas mutações e confirmar diagnósticos de hemoglobinopatias mais complexos. A mutação da Hb Stanleyville II correspondente ao códon 78 na terceira base (AAC>AAA), no gene híbrido $-\alpha^{3.7}$, é incomum e parece ser o segundo caso descrito no Brasil.

Palavras Chave: Hemoglobinas variantes. Sequenciamento genético. Talassemia alfa. Hemoglobina S. Programa de Triagem neonatal.

ABSTRACT

ESQUENAZI, Marcos Isaac. *Genetic sequencing and alpha thalassemia detection of hemoglobins variants with physical-chemical behavior similar to the Hb S (S-like) from children of Rio de Janeiro Newborn Screening Program*. 77 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Brazilian population is characterized by having a unique genetic composition which is a result of its intense miscegenation throughout history. Genetic recombination resulting from this process can lead to diseases such as hemoglobinopathies. Some hemoglobin variants have physical-chemical behavior similar to the Hb S and are referred as S-like. These molecules can lead to a false diagnosis of sickle cell trait and are usually asymptomatic, however when in combination with other hemoglobinopathies and thalassemias they may represent important hematological alterations and critical clinical conditions. This study aimed to identify by genetic sequencing S-like hemoglobins of Rio de Janeiro Newborn Screening Program, and to verify the association of these variants with alpha thalassemia. For the purpose of this study, 17 blood samples of newborns were selected from October, 22, 2010 to February 1, 2017, which presented in their investigation hemoglobinopathies, hemoglobin variants in S-Window, by the methodology HPLC) - ULTRA 2™ with the Genesys Ultra Screening Kit (Trinity Biotech, Jamestown, NY). They were submitted by molecular analysis through PCR to verify the presence of alpha thalassemia and genetic sequencing of alpha (HBA) and beta chains of the hemoglobin (HBB). The HPLC-VARIANT® technique with the β-Thalassemia Short kit (Bio-Rad, California, USA) was performed to reassess the hemoglobin profile. Chromatograms revealed characteristic profiles of 4 Hb Stanleyville II, 5 Hb D-Punjab, 5 Hb Korle-Bu, 1 Hb Constant Spring and 2 undefined variants. The molecular analysis showed that 8 samples (47.05%) had the $-\alpha^{3.7}/\alpha$ deletion. The sequencing of the alpha gene performed on 3 samples revealed the presence of Hb Stanleyville II, however with the mutation present in the $-\alpha^{3.7}$ hybrid gene, unlike most cases described in the literature. In the beta globin gene, the polymorphisms found were the same for the three samples sequenced: one in the first exon and two in the second intron. In conclusion, Hb Stanleyville II, D-Punjab and Korle-Bu although not frequent, in the state of Rio de Janeiro are not uncommon. The association between $-\alpha^{3.7}$ and the S-like variants found in the research is frequent. The study of HBB and HBA genes by sequencing methodology is necessary to identify new mutations and to confirm the diagnoses of more complex hemoglobinopathies. The mutation of Hb Stanleyville II corresponding to codon 78 at the third baseline (AAC> AAA) in the hybrid gene $-\alpha^{3.7}$ is uncommon and appears to be the second case described in Brazil.

Keywords: Hemoglobins variants. Genetic sequencing. Alpha thalassemia. Hemoglobin S. Newborn Screening Program.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Representação esquemática da molécula de hemoglobina...	17
Figura 2 -	Representação dos cromossomos humanos 16 e 11.....	18
Figura 3 -	Expressão das cadeias de globina ao longo das fases do desenvolvimento	19
Figura 4 -	Representação das regiões homólogas X, Y, Z e não homólogas I, II, III.....	29
Figura 5 -	Esquema da recombinação recíproca entre os segmentos Z produzindo deleção $-\alpha^{3.7}$ ou deleção à direita.....	30
Figura 6 -	Classificação com alterações dos genes da talassemia alfa e expressões fenotípicas.....	31
Figura 7-	Fluxograma representativo do estudo.....	38
Figura 8 -	Representação esquemática do cluster de genes α -globina. A figura indica as extensões de cada deleção representada no ensaio de PCR-multiplex e posições relativas dos primers.....	41
Figura 9 -	Perfis dos Cromatogramas característicos das Hb encontradas.....	48
Figura 10 -	Produtos da PCR Multiplex para deleções alfa talassêmicas	49
Figura 11 -	Produtos purificados pós-PCR a partir da fatia do gel de agarose.....	50
Figura 12 -	Amplificação do gene da Beta globina pela PCR.....	50
Figura 13 -	Eletroferogramas referentes ao gene híbrido $-\alpha^{3.7}$ de três crianças do estudo.....	51
Figura 14 -	Eletroferogramas do gene <i>HBB</i> de três crianças do estudo.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tamanho da amostra para a frequência em uma população	34
Tabela 2 -	Sequência dos iniciadores utilizados no diagnóstico molecular da talassemia alfa.....	42
Tabela 3 -	Iniciadores utilizados para amplificação do gene HBA.....	43
Tabela 4	Iniciadores utilizados para amplificação do gene HBB.....	44
Tabela 5 -	Iniciadores utilizados para as reações de sequenciamento dos genes HBA.....	46
Tabela 6	Iniciadores utilizados para as reações de sequenciamento do gene HBB.....	46
Tabela 7 -	Resultado dos perfis das hemoglobinas normais e variantes com seus TR's.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AF	Anemia Falciforme
<i>Ala</i>	Alanina
<i>Asn</i>	Asparagina
<i>Asp</i>	Aspartato
α -Tal	Alfa Talassemia
C	Citosina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
CHGM	Concentração de Hemoglobina Globular Média
DF	Doença Falciforme
dL	Decilitro
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
dNTPs	Desoxinucleotídeos
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FIE	Focalização Isoelétrica
fL	Fentolitro
g	Gramma
G	Guanina
<i>Glu</i>	Glutamina
Hb	Hemoglobina
HBA	Gene alfa da hemoglobina
HBA1	Gene alfa 1 da hemoglobina
HBA2	Gene alfa 2 da hemoglobina
Hb A	Hemoglobina do tipo A
Hb A2	Hemoglobina do tipo A2
Hb AS	Traço falciforme
HBB	Gene beta da hemoglobina
Hb C	Hemoglobina do tipo C
Hb E	Hemoglobina do tipo E
Hb F	Hemoglobina fetal
HGM	Hemoglobina Globular Média
<i>His</i>	Histidina

Ht	Hematócrito
L	Litro
LCR	<i>Locus Control Region</i> (Região de Controle do Locus)
Lys	Lisina
Kb	Kilobase (mil pares de bases)
Kg	Kilograma
Ng	Nanograma
µL	Microlitro
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mmol	Milimol
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pg	Picograma
pH	Potencial de Hidrogênio
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
PETN	Programa Estadual de Triagem Neonatal
pmol	Picomol
RDW	<i>Red Cell Distribution Width</i> (Amplitude de Distribuição do Volume dos Eritrócitos)
RFLP	Polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição
RJ	Rio de Janeiro
Stop	Códon de parada
T	Timina
TBE	Tris-Ácido Bórico-EDTA
U	Unidades
V	Volts
Val	Valina
VGM	Volume Globular Médio

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	15
1	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
1.1	Estrutura da hemoglobina.....	17
1.2	Hemoglobina S e doença falciforme (DF).....	20
1.3	Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN).....	21
1.4	Hemoglobinas variantes.....	22
1.5	Hemoglobina Stanleyville-II.....	23
1.6	Hemoglobina D-Los Angeles / D-Punjab.....	25
1.7	Hemoglobina Korle-Bu.....	26
1.8	Hemoglobina Constant Spring.....	27
1.9	Talassemia alfa.....	28
2	OBJETIVO GERAL.....	33
2.1	Objetivos específicos.....	33
3	PACIENTES E MÉTODOS.....	34
3.1	População e Alvo.....	34
3.1.1	<u>Critérios de inclusão</u>.....	35
3.1.2	<u>Critérios de exclusão</u>.....	35
3.2	Questões éticas.....	35
3.3	Diagnóstico das hemoglobinopatias no Rio de Janeiro.....	36
3.4	Obtenção de amostras e fluxograma do estudo.....	36
3.5	Análise do perfil de hemoglobinas por HPLC.....	39
3.6	Isolamento de DNA Genômico do Sangue Periférico.....	40
3.7	Diagnóstico Molecular da Talassemia alfa (PCR-Multiplex)	40
3.8	Amplificação do Gene Alfa pela Reação em Cadeia da Polimerase .	42
3.9	Amplificação do Gene Beta pela Reação em Cadeia da Polimerase	44
3.10	Purificação dos produtos pós-PCR	44
3.11	Reação de sequenciamento e eletroforese capilar	45

4.	RESULTADOS	47
5	DISCUSSÃO	53
	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICE A - Instrumento de Coleta de Dados.....	67
	APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	69
	ANEXO A - Parecer consubstanciado de projeto de Pesquisa aprovado pelo CEP Hemorio	71
	ANEXO B - Parecer de aprovação no CEP – Hemorio	73
	ANEXO C - Declaração de participação do LACFAR no projeto de Pesquisa	76
	ANEXO D - Participação do IBEx como instituição coparticipante no projeto	77

INTRODUÇÃO

A estrutura genética da população brasileira é resultado de um prolongado processo de miscigenação, que se inicia juntamente com a nossa história e se intensifica ao longo do tempo. Os portugueses, ainda no período colonial ao se instalarem no país, através da imigração escrava, trouxeram os negros do continente Africano e aproximaram-se dos indígenas, nativos da região. O entrecruzamento dessas raças e a restrita contribuição étnica de holandeses e ingleses, ainda no século XVI, resultou na singularidade da composição étnica do Brasil.

Dentre os muitos sinais herdados, estão alterações gênicas que podem resultar em doenças, como as hemoglobinopatias. As anormalidades que resultam na alteração da molécula de hemoglobina (Hb) estão entre as mais comuns e acometem milhões de pessoas em todo o mundo. As talassemias que se caracterizam pelo defeito na síntese de uma ou mais cadeias globínicas da molécula de hemoglobina, (herdadas dos europeus, asiáticos, entre outros) e a anemia falciforme (AF) vinda dos escravos da África, estão entre as doenças genéticas mais frequentes no mundo. Estima-se que 10% da população mundial seja portadora dos genes da hemoglobina S (Hb S) e talassemias (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 1997).

A prevalência da AF no Brasil é heterogênea, dependendo da região geográfica, bem como do grupo étnico estudado, sendo mais elevada nas regiões que mantiveram rotas de tráfico de escravos com países africanos, como alguns estados do nordeste e Rio de Janeiro (FLEURY, 2007). Os crescentes casos de hemoglobinopatias, principalmente da anemia falciforme na população brasileira, motivaram medidas, dentre elas a que tornou obrigatória a inclusão do exame para detecção de doença falciforme (DF), na fase II do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), instituído pela portaria nº 822/GM, de 6 de junho de 2001 (BRASIL, 2001).

O Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (HEMORIO) é um centro de excelência, cuja missão é prestar assistência nas áreas de hematologia e hemoterapia à população do Estado. O Instituto atua nas áreas de assistência, ensino e pesquisa com base nos seus valores institucionais de humanização com tratamento digno à pessoa humana.

O HEMORIO foi o órgão responsável e credenciado junto ao Ministério da Saúde, no estado do Rio de Janeiro, pela realização do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), para diagnóstico da Doença Falciforme atendendo 92 municípios até 01 de fevereiro de 2017.

A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e a focalização isoelétrica (IEF) são alguns dos métodos utilizados para a triagem neonatal das hemoglobinopatias. Embora sejam métodos que apresentem sensibilidade e especificidade para o diagnóstico neonatal das hemoglobinas de maior frequência e importância clínica (Hb S, Hb C, Hb D, Hb E), apresentam algumas limitações para diferenciação de determinadas variantes. Portanto, o Ministério da Saúde sugere a confirmação da doença falciforme triada no PNTN (BRASIL, 2001) por metodologia molecular.

Segundo o *Globin Gene Server* (<http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>) existem descritas até o momento mais de 1.200 hemoglobinas variantes e muitas destas possuem comportamentos físico-químicos semelhantes ao da Hb S (*S-like*), o que pode causar falso diagnóstico de doença falciforme se não forem devidamente confirmadas (CHINELATO-FERNANDES; BONINI-DOMINGOS, 2005; FUCHAROEN *et al.*, 2007; JORGE *et al.*, 2007).

A maioria das hemoglobinas variantes são assintomáticas, porém em associação com outras hemoglobinopatias e talassemias, podem resultar em doença grave (FUCHAROEN *et al.*, 2007).

Resultados obtidos após 10 anos de PNTN-RJ em uma amostra de 1.217.833 neonatos, revelaram uma das frequências mais elevadas de hemoglobinopatias no Brasil, onde 4,87% mostraram ser heterozigotos para alguma hemoglobina anormal e o diagnóstico de hemoglobinopatias para 314 não foram conclusivos (LOBO *et al.*, 2014). Esse diagnóstico pode gerar insegurança e incertezas nos familiares destas crianças.

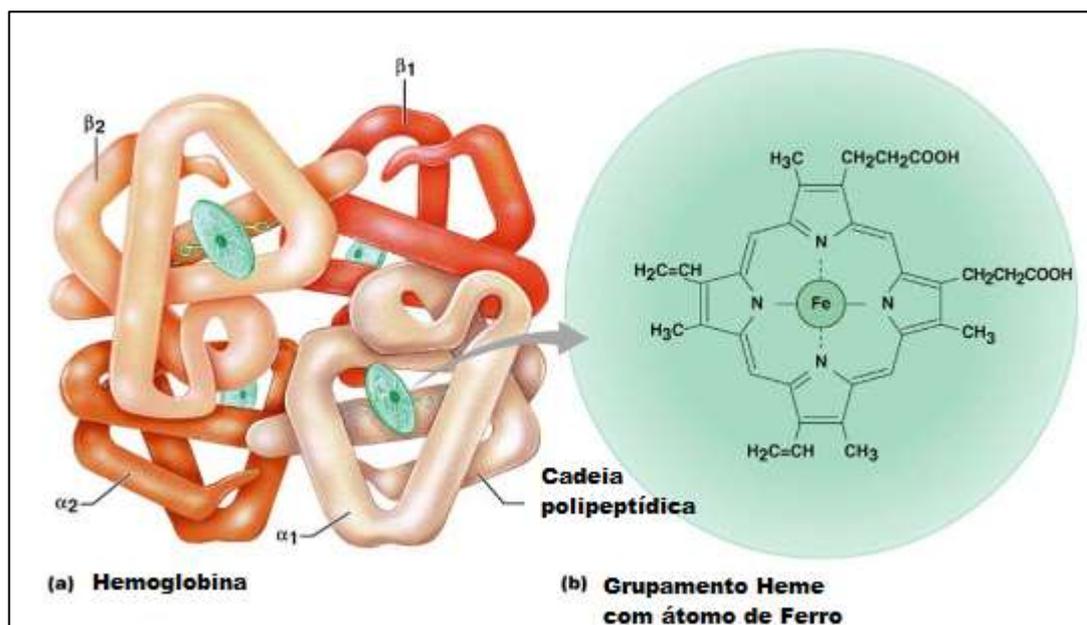
O objetivo do estudo foi a identificação das hemoglobinas *S-like*, triadas do PNTN-RJ, pela metodologia de sequenciamento gênico (Sanger) e verificar a presença da associação destas hemoglobinas variantes com a talassemia alfa (α -Tal). A partir desta identificação, acredita-se na possibilidade da redução do falso diagnóstico de traço falciforme. Além disso, o estudo poderá indicar um perfil de variantes diferente do que se imagina e contribuir no conhecimento da pluralidade genética da nossa população.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Estrutura da Hemoglobina

A hemoglobina é a proteína portadora de oxigênio encontrada nos glóbulos vermelhos (eritrócitos). É um tetrâmero constituído por duas cadeias de polipeptídeos do *locus* de alfa-globina, juntamente com duas cadeias polipeptídicas a partir do *locus* da beta-globina. A cada cadeia globínica existe um grupamento heme que possui um anel protoporfirínico com um átomo de ferro (Fe^{+2}) central capaz de ligar-se reversivelmente com o oxigênio (Figura 1)

Figura 1 – Representação esquemática da molécula de hemoglobina.

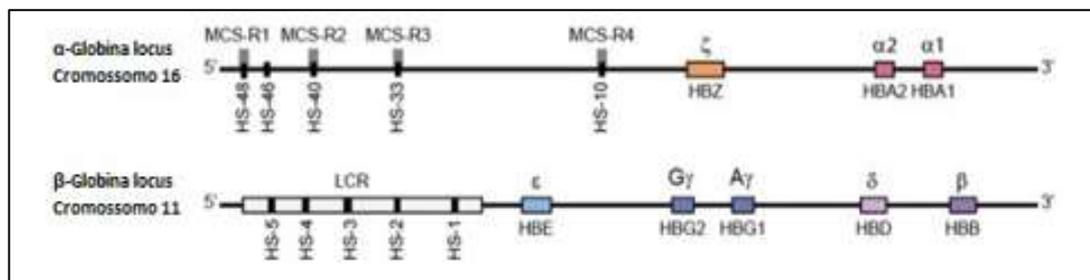


Fonte: Pearson Education Inc., por Benjamin Cummings (disponível em: <http://slideplayer.com.br/slide/356207/>).

O *locus* da α -globina e o da β -globina contêm cada um vários genes que são expressos de forma específica em tecido e estágio, a fim de atender às necessidades de oxigênio do embrião ou do feto em crescimento (WILBER; NIENHUIS; PERSONS, 2011).

Os *loci* humanos dos genes da α -globina (*HBA*) e β -globina (*HBB*) estão localizados em diferentes cromossomos e contêm múltiplos genes ativados de forma evolutiva e sequencial na direção 5' a 3' (WEATHERALL, 2001). O *locus* α -globina está localizado no braço curto do cromossomo 16 (16p13.3) e contém três genes funcionais: um gene da globina embrionária zeta (ζ) e dois genes das globinas adultas alfa 1 (*HBA1*) e alfa 2 (*HBA2*), enquanto o *locus* da β -globina está localizado no cromossomo 11 (11p15.5) e contém cinco genes ativos: um gene embrionário *epsilon* (ϵ), dois fetais gama (γ) - $G\gamma$ e $A\gamma$ e dois genes adultos delta e beta (δ e β -globina) (Figura 2). Os genes humanos $G\gamma$ e $A\gamma$ -globina são altamente homólogos e as proteínas expressas só diferem no aminoácido 136, onde ocorre uma substituição de glicina a alanina (MANCA; MASALA, 2008).

Figura 2 - Representação dos cromossomos humanos 16 e 11;



Legenda: Organização do locus humano da α e β -globina nos cromossomos 16 e 11.

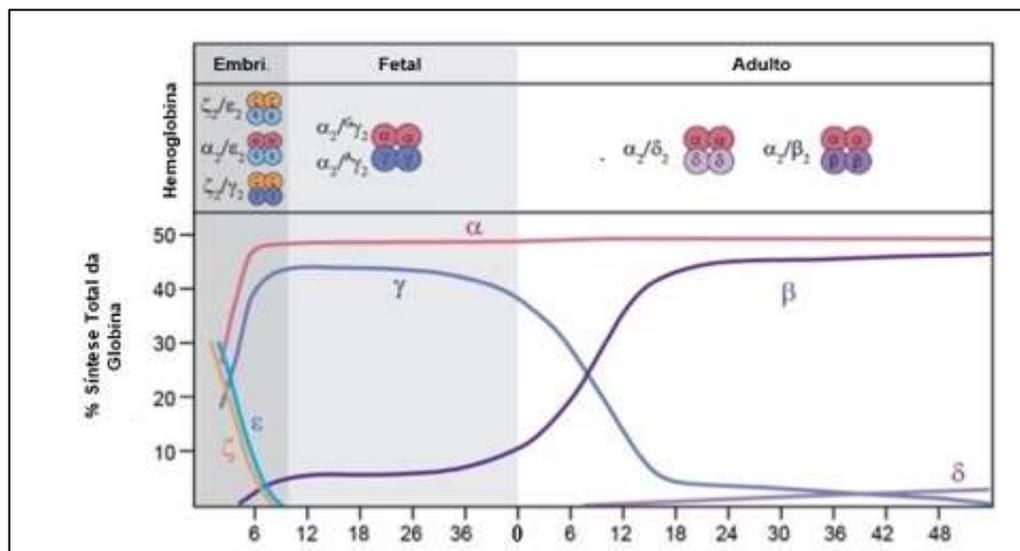
Fonte: MARTYN, 2017.

A eritropoiese da fase embrionária envolve a circulação transitória de grandes glóbulos vermelhos nucleados que se originam no saco vitelino (eritropoiese primitiva). Durante o desenvolvimento na vida fetal e pós-natal, a eritropoiese envolve a produção contínua de pequenos eritrócitos enucleados (PALIS, 2008). Os *loci* α e β -globina são ativados no final da terceira semana de gestação (GROSVELD; DILLON; HIGGS, 1993), com ζ -globina e ϵ -globina sendo expressas em eritroblastos primitivos até 5 semanas após a concepção (MARTYN; QUINLAN; CROSSLEY, 2017) (Figura 3).

As cadeias globinas α -semelhantes e β -semelhantes produzidas nos vários estágios do desenvolvimento humano se combinam para formar três tipos amplos de hemoglobina: hemoglobina embrionária (Gower 1 - $\zeta_2\epsilon_2$, Gower 2 - $\alpha_2\epsilon_2$ e Portland -

$\zeta_2\gamma_2$), hemoglobina fetal (Hb F) ($\alpha_2\gamma_2$ e $\alpha_2\delta_2$) e hemoglobina adulta ($\alpha_2\beta_2$ e $\alpha_2\delta_2$) (MANCA; MASALA, 2008) (Figura 3). Cada uma dessas formas de hemoglobina exibe diferentes propriedades. Por exemplo, a hemoglobina fetal (HbF) tem maior afinidade pelo oxigênio do que a hemoglobina adulta (HbA), auxiliando na transferência de oxigênio da corrente sanguínea da mãe para o feto (AMATO *et al.*, 2014). No momento do nascimento, HbF representa cerca de 70-80% da hemoglobina total em um indivíduo, no entanto, um ano depois, a HbF geralmente representa apenas aproximadamente 1% dos níveis de hemoglobina total (MANCA; MASALA, 2008), exceto quando mutações ou efeitos fisiológicos, como a hipoxia, levam à persistência ou reativação da hemoglobina fetal.

Figura 3 - Expressão das cadeias de globina ao longo das fases do desenvolvimento.



Legenda: A expressão dos diferentes genes da globina durante o desenvolvimento pré e pós-natal, mostrada com uma porcentagem da síntese total de globina. A composição das cadeias de globina α e β -semelhantes da hemoglobina nas fases do desenvolvimento.

Fonte: MARTYN, 2017.

1.2 Hemoglobina S e doença falciforme (DF)

A anemia falciforme é uma doença genética de transmissão hereditária. A alteração genética dessa doença é responsável pela formação de um tipo anormal de hemoglobina chamado de “hemoglobina S”. Foi descrita pela primeira vez em 1910 por Herrick (GÓMEZ-CHIARI; TUSELL PUIGBERT; ORTEGA ARAMBURU, 2003; HERRICK, 2001), frequente, mas não exclusiva, em indivíduos de origem africana, esta Hb é originada por uma mutação no DNA que resulta na substituição de um ácido glutâmico (GAG) pela valina (GTG) na posição 6 da extremidade N-terminal no gene que sintetiza a cadeia β da globina. Os eritrócitos cujo conteúdo predominante é a hemoglobina S, sofrem alterações na estabilidade e solubilidade moleculares que em condições de hipóxia, acidose e desidratação assumem forma semelhante à de uma foice, decorrente da polimerização desta hemoglobina (STUART; NAGEL, 2004).

A anemia falciforme é a apresentação homocigota da doença (Hb SS), ou seja, ocorre quando o defeito é herdado de ambos os pais; já quando se apresenta na forma heterocigota (Hb AS), ou seja, o defeito é herdado de somente um dos progenitores, é conhecido como “traço falciforme”. É uma doença que se caracteriza por possuir grande heterogeneidade clínica, podendo variar desde formas leves até manifestações graves, com altas taxas de mortalidade (DE GALIZA NETO; DA SILVA PITOMBEIRA, 2003).

Os primeiros sinais clínicos da AF em geral começam a se manifestar a partir do sexto mês de vida, quando a concentração de Hb S é maior em relação a hemoglobina fetal.

Dentre as complicações clínicas, mais frequentes, apresentadas em portadores dessas hemoglobinopatias estão as infecções, acidente vascular encefálico, síndrome torácica aguda, sequestro esplênico e crises dolorosas (SILVA FILHO, 2010).

No Brasil, a DF é um importante problema de saúde pública. Estima-se que o número de indivíduos com traço falciforme seja de 7.200.000, com prevalência da população geral entre 2 e 8%. Em negros e afrodescendentes a frequência sobe para 6% a 10%, sendo também observada um aumento na população caucasóide, por conta da miscigenação intensa no país (CANÇADO; JESUS, 2007; NUZZO; FONSECA, 2004). A incidência de DF no estado do Rio de Janeiro é de 1: 1.335 nascimentos e a incidência de traço falciforme é de cerca de 5%, ou seja, 1:20

nascimentos (LOBO *et al.*, 2014), ocupando a segunda maior frequência do Brasil, ficando apenas após o estado da Bahia com 1:17 nascimentos (Fonte: Programas Estaduais de Triagem Neonatal (PETN) – VII Simpósio Brasileiro de Doença Falciforme, Salvador-BA, 2013).

1.3 Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN)

Ao serem incluídas, as hemoglobinopatias no Programa Nacional de Triagem Neonatal (Brasil, 2001), um passo importante foi dado no reconhecimento da sua relevância em saúde pública no Brasil. Dentre os benefícios dessa Portaria, estava a garantia do acesso aos testes de triagem a todos recém-nascidos brasileiros, independentemente da origem geográfica, etnia e classe sócio econômica (RAMALHO; MAGNA; PAIVA E SILVA, 2003).

Em agosto de 2000, o programa de triagem de recém-nascidos para hemoglobinopatias já estava em funcionamento no Instituto de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (HEMORIO), que até 01 de fevereiro de 2017 era o órgão responsável e credenciado junto ao Ministério da Saúde, no Estado do Rio de Janeiro, para realização no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN).

No estado do Rio de Janeiro o programa realiza a triagem para hemoglobinopatias recebendo amostras de 92 municípios. O “teste do pezinho”, nome popular para a triagem neonatal, é feito a partir de gotas de sangue colhidas do calcanhar do recém-nascido em papel filtro, preferencialmente, entre o 3º e o 7º dia de vida.

Após a análise dos cromatogramas no instituto, em casos suspeitos de doença falciforme, transfusão ou presença de hemoglobina variante, o serviço de assistência social do programa convoca os integrantes da família a fim de complementar o estudo. Uma nova punção é realizada na criança e na mãe, o teste também é ofertado ao pai, embora o mesmo não seja obrigado a fazê-lo. É aberto um prontuário para o paciente e uma primeira consulta é realizada para as orientações e informações sobre a doença, nos casos confirmados de doença falciforme.

No caso das hemoglobinas variantes os responsáveis recebem a informação da existência de uma hemoglobina variante “desconhecida”. Os resultados são

enviados aos postos onde foram realizadas as coletas e neles são prestadas orientações necessárias aos familiares da criança.

A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e a focalização isoelétrica (IEF) são os métodos utilizados para a triagem neonatal das hemoglobinopatias. Embora sejam métodos que apresentem sensibilidade e especificidade para o diagnóstico neonatal das hemoglobinas de maior frequência e importância clínica, essas técnicas apresentam limitações pois nem todas as variantes podem ser diagnosticadas por esses princípios, levando-se em consideração que as mutações que envolvem trocas as quais acarretam pequenas ou nenhuma diferença de carga elétrica devido a substituição por aminoácidos neutros não são detectadas (SILVA, 2012).

1.4 Hemoglobinas Variantes

As alterações que envolvem genes estruturais promovem a formação de moléculas de hemoglobinas com características bioquímicas diferentes das hemoglobinas normais, por isso são denominadas variantes, em sua maioria originada por substituições de aminoácidos resultantes de mudanças nas sequências de nucleotídeos das cadeias α , β , δ , γ das hemoglobinas A, A₂ e F. As mutações afetando genes reguladores promovem desequilíbrio do conteúdo quantitativo das cadeias e, conseqüentemente, dos tipos normais de hemoglobinas, causando as talassemias (ORLANDO *et al.*, 2000).

Existem descritas até o momento mais de 1.200 hemoglobinas variantes em consulta realizada em 01 julho de 2017, segundo o *Globin Gene Serve*, (<http://globin.bx.psu.edu/cgibin/hbvar/counter>). Como já citado anteriormente, as hemoglobinas de maior frequência e importância clínica são as Hb S, Hb C, Hb D, Hb E, porém, novas variantes já foram descritas no Brasil como Hb Itapira, Hb Bom Jesus da Lapa, Hb Boa Esperança (JORGE *et al.*, 2007), Hb S-São Paulo (JORGE *et al.*, 2012), Hb Stanleyville II (COSTA *et al.*, 1987; COSTA; SONATI; ZAGO, 1991; SILVA *et al.*, 2012; WAGNER *et al.*, 2010; WENNING *et al.*, 2000), Hb Hasharon (CHINELATO-FERNANDES; BONINI-DOMINGOS, 2005; WENNING *et al.*, 2000); Hb Ottawa, Hb Maputo, Hb G-Ferrara, Hb St Luke's, Hb Etobicoke (SILVA *et al.*, 2012).

A associação de hemoglobinas variantes com outras hemoglobinopatias e talassemias, como consequência do processo de miscigenação característico do Brasil, torna o diagnóstico de hemoglobinopatias, um desafio.

1.5 Hemoglobina Stanleyville-II

A Hemoglobina Hb Stanleyville-II [$\alpha_2 78$ (EF7) Asn> Lys] é uma variante causada por uma única substituição de aminoácidos no códon 78 na região não-helicoidal entre as hélices E e F (EF7) da alfa globina (Asn> Lys). Encontrada pela primeira vez em uma família africana na tribo Budu em 1950 e descrita em 1959, na cidade Stanleyville atualmente conhecido como Kisangani, República Democrática do Congo (DHERTE *et al.*, 1959). Esta variante foi encontrada em famílias africanas ou brancas europeias e americanas que vivem no Congo, Uganda, Zaire, Texas (EUA) e Alsace (França) (DHERTE *et al.*, 1959; HASSAN *et al.*, 1977) sendo descrita mais tarde, em outros países da África (DRAUBE *et al.*, 2007; WAITUMBI *et al.*, 2007); (BURCHALL; MAXWELL, 2010), Europa (GONZÁLEZ FERNANDO *et al.*, 2008); (OSTENDORF *et al.*, 2005).

No Brasil, em 1987 foi descrito o primeiro caso concomitante na forma homocigota para Hb Stanleyville II e Hb S, em uma menina negra com quatro anos de idade, apresentando microcitose, hipocromia e quadro clinicamente compatível com anemia falciforme. Esse estudo descreve a avaliação de duas famílias brasileiras não relacionadas, que incluem dois heterocigotos para Hb Stanleyville II, dois heterocigotos para Hb Stanleyville e Hb S e um homocigoto para as duas hemoglobinas anormais associada a talassemia alfa (COSTA *et al.*, 1987; COSTA; SONATI; ZAGO, 1991).

Wenning e colaboradores em 2000, estudaram 27 indivíduos com alterações estruturais de cadeia alfa, com o objetivo de identificar as mutações do gene α -globina presentes na população do Sudeste do Brasil. As deleções $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{MED}$ e $-(\alpha)^{20.5}$ foram investigadas por PCR. Dentre os 27 pacientes com alterações estruturais de cadeia alfa, 4 (3 negros e 1 caucasiano) foram heterocigotos para Hb Stanleyville-II ($\alpha 78\text{Asn}\rightarrow\text{Lys}$) associados à α^+ -talassemia confirmando a mutação no gene da $\alpha 1$ -globina pela substituição de AAC > AAA, realizada pela metodologia de

sequenciamento, 15 (de descendência italiana) tiveram a presença da Hb Hasharon ($\alpha 47\text{Asp}\rightarrow\text{His}$) associadas à deleção $-\alpha^{3,7}$, 4 (de descendência italiana) foram heterozigotos para Hb J-Rovigo ($\alpha 53\text{Ala}\rightarrow\text{Asp}$), 1 (negro) foi heterozigoto para Hb G-Pest ($\alpha 74\text{Asp}\rightarrow\text{Asn}$), 1 (caucasiano) era heterozigotos para Hb Kurosaki ($\alpha 7\text{Lys}\rightarrow\text{Glu}$), 1 (caucasiano) era heterozigoto para Hb Westmead ($\alpha 122\text{His}\rightarrow\text{Gln}$) e 1 (Caucasiano) era o portador de uma nova variante silenciosa (Hb Campinas, $\alpha 26\text{Ala}\rightarrow\text{Val}$). A maioria das mutações encontradas refletiram as origens mediterrânea e africana da população. Os portadores de Hb Hasharon e Hb Stanleyville-II apresentaram hemácias microcíticas e hipocrômicas leves, provavelmente devido à associação com a talassemia.

No programa de triagem neonatal do estado do Rio Grande do Sul, outro estudo realizado com objetivo de estimar a prevalência de hemoglobinopatias no sul do Brasil, analisou 437.787 amostras de sangue de neonatos pelas técnicas de focalização isoelétrica e / ou cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Dentre elas, 6391 apresentaram um padrão anormal de hemoglobina e 71 (0,02%) neonatos eram portadores de variáveis raras de hemoglobina. As Hbs variantes raras foram identificadas por sequenciamento de DNA em 47 desses casos, 26 com mutações nos genes da alfa-globina e 21 com as mutações no gene da beta-globina. Dentre as 26 variantes de cadeia alfa, 12 casos de Hb Stanleyville II. Os benefícios da identificação de variantes raras durante o rastreio neonatal são evidentes porque alguns deles são clinicamente relevantes como a Hb Stanleyville II quando associada a deleção $-\alpha^{3,7}$ resulta em um fenótipo talassêmico (WAGNER *et al.*, 2010).

Silva e colaboradores (2012), com os dados do Programa de Triagem Neonatal, estimaram a incidência de Hb Stanleyville-II no estado de Minas Gerais, Brasil. A focalização isoelétrica (IEF) e cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foram as técnicas realizadas para o diagnóstico de hemoglobinopatias com as amostras de sangue seco em papel filtro. No período de março de 1998 a junho de 2008, 294 crianças foram triadas provenientes de 56 cidades de MG, cujo primeiro resultado da triagem neonatal havia sido liberado como indeterminado e o resultado da amostra do 6º mês de vida, registrado como perfil eletroforético semelhante ou idêntico ao da hemoglobina S. Da coorte original 128 crianças foram testadas para o alelo β^s e apenas 12 foram positivas, das quais seis foram associadas a outra variante, sendo três com Hb Stanleyville II. Seguindo o estudo para hemoglobinas variantes “raras”, foram selecionadas 112 crianças e a evidenciando a presença de Hb

Stanleyville II em 96 casos (85,7%) com 94 em heterozigose e 2 na forma homozigota co-herdado com $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$. Como consequência desse estudo de 10 anos do PNTN-MG, a incidência de Hb Stanleyville II no estado é de 1:11500 nascimentos, com indícios de ter sido trazida por escravos africanos durante o período colonial (SILVA *et al.*, 2012).

1.6 Hemoglobina D-Los Angeles / Hemoglobina D-Punjab

A hemoglobina D-Punjab, também conhecida como hemoglobina D-Los Angeles é uma das variantes mais comuns em todo mundo. Deriva de uma mutação pontual na posição 121 do gene da beta globina ($\underline{GAA} \rightarrow \underline{CAA}$), resultante da substituição do ácido glutâmico pelo aminoácido glutamina [beta 121(GH4) Glu>Gln; HBB: c.364G>C] (FUCHAROEN *et al.*, 2002)

Até o início da década de 1950, apenas quatro tipos de hemoglobinas haviam sido descritas, incluindo a hemoglobina adulta (Hb A) e duas variantes (Hb S e Hb C). A quarta hemoglobina identificada foi Hb D. No estudo de uma família multiétnica, da região de Los Angeles, com características britânicas, americanas e indianas, encontrou-se uma hemoglobina com características diferentes das demais conhecidas. Sua mobilidade eletroforética era semelhante à Hb S em pH alcalino, no entanto em pH ácido, sua migração se assemelhava a Hb A (ITANO, 1951).

A Hb D-Los Angeles é encontrada principalmente na região de Punjab, noroeste da Índia. É comumente relatada em paquistaneses, afro-americanos, afro-caribenhos, norte-americanos e sul-americanos (OBEROI *et al.*, 2014). Sua forma heterozigota em associação com a hemoglobina A não causa alterações clínicas ou hematológicas. Em homozigose, forma mais rara de hereditariedade, pode apresentar, discreto grau de anemia. Além disso, esta variante pode existir em associação com outras hemoglobinopatias, bem como as talassemias. As alterações clínicas mais notáveis ocorrem quando a Hb D-Punjab está associada a Hb S. As manifestações clínicas desta associação, podem ser semelhantes à homozigose da Hb S e mesmo com importância clínica, especialmente nesses casos, ainda é pouco estudada (TORRES *et al.*, 2015).

No Brasil, um estudo realizado em 1993, avaliou a prevalência de hemoglobinopatias em cerca de 100.000 indivíduos de todo os estados do país, a Hb D-Punjab foi observada como a terceira variante de hemoglobina mais comum (BONINI-DOMINGOS, 1993).

Sonati e colaboradores, em 1996 analisaram 11.914 indivíduos com suspeita de mutações em hemoglobinas e seus familiares, atendidos no Hospital Universitário da UNICAMP Universidade de Campinas), no estado de São Paulo no sudeste do Brasil. Os autores relataram alterações em 4.102 (34,4%) dos indivíduos, dos quais 0,4% apresentavam Hb D-Punjab (SONATI *et al.*, 1996).

Com o objetivo de estimar a incidência e o curso natural de uma coorte de recém-nascidos com hemoglobina SD, no período de 1999 a 2012, um estudo realizado no PNTN-MG revelou 11 casos (dez famílias) de Hb S / D-Punjab e 8 de Hb S /Hb Korle-Bu. A focagem isoelétrica foi o principal método utilizado na triagem neonatal. O RFLP (Polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição) e o sequenciamento genético foram utilizados para identificar alelos mutantes e haplótipos. Foi realizado também GAP-PCR (reação em cadeia da polimerase) para verificar a presença de alfa-talassemia (REZENDE *et al.*, 2016).

1.7 Hemoglobina Korle-Bu

A Hb Korle-Bu é uma variante, com padrão eletroforético semelhante ao da Hb D-Los angeles, que deriva de uma mutação pontual com a substituição do ácido aspártico pelo aminoácido asparagina (GAT-> AAT) no códon 73, do éxon 2 da globina do gene beta [beta73 (E17) Asp-> Asn]. A associação dessa hemoglobina a outros tipos de alterações como talassemias ou outras hemoglobinopatias, pode apresentar um quadro clínico mais grave, logo a caracterização genética é importante para o diagnóstico das formas graves. (ROPERO; VILLEGAS; GONZÁLEZ, 2004).

Chinelato-Fernandes e Bonini-Domingos realizaram um trabalho com objetivo de identificar e caracterizar as variantes de hemoglobinas, provenientes de oito estados do Brasil, que apresentavam migração eletroforética semelhante à Hb S em pH alcalino (acetato de celulose), relacionando-as com as diferentes populações. A Hb Korle-Bu é encontrada principalmente em famílias provenientes de Gana e Costa

do Marfim, países africanos que contribuíram para a formação da população brasileira através do tráfico de escravos. Dados históricos indicam que os indivíduos dessa região foram levados preferencialmente para a região da Bahia. As amostras descritas neste estudo, foram provenientes de indivíduos das regiões sudeste, sul e centro-oeste. Isto pode ser explicado pelo intenso fluxo migratório interno de indivíduos nordestinos para outros estados, em busca de novas oportunidades de emprego. (CHINELATO-FERNANDES; BONINI-DOMINGOS, 2005).

Um estudo no Centro de Promoção da Saúde Região 8, Nakornsawan, Tailândia descreveu uma mulher grávida de 26 anos descoberta através do programa de triagem de talassemia com anemia microcítica hipocrômica leve causada por defeitos na alfa e beta-globina. A análise inicial de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) de hemoglobina, revelou uma homozigose para uma variante desconhecida na janela D, inconsistente com os resultados das análises familiares. Mais análises de Hb usando eletroforese de zona capilar automatizada identificaram que a gestante era de fato um heterozigoto composto para Hb E [β 26 (B8) Glu→Lys, GAG>AAG] e outra variante de cadeia beta. A análise de DNA demonstrou que ela carregou a mutação de Hb Korle-Bu [B73 (E17) Asp→Asn (GAT>AAT)] para a Hb E e uma talassemia alfa-1 (α -thal-1) com deleção do Sudeste Asiático ($--^{SEA}$). Estudo de seus familiares revelaram que seu pai e sua irmã eram duplos heterozigotos para Hb Korle-Bu e α -thal-1, enquanto que sua mãe era um duplo heterozigoto para Hb E / Hb Constant Spring [Hb CS; A142, Term→Gln (TAA>CAA α 2)]. O diagnóstico de Hb Korle-Bu pode se tornar um problema em uma investigação de rotina quando encontrado em associação com outras hemoglobinopatias. A Hb Korle-Bu não se separa da Hb E e Hb A2 em análise de HPLC, porém o sistema de eletroforese capilar auxilia nesta avaliação. No entanto, o diagnóstico final do caso só foi possível após a análise do DNA (SIRIRATMANAWONG *et al.*, 2009).

1.8 Hemoglobina Constant Spring

A hemoglobina Constant Spring (Hb CS) é uma variante de cadeia do gene α 2-globina no códon 142, com substituição de TAA > CAA . Esta mutação T>C resulta em uma extensão da cadeia alfa com 31 resíduos de aminoácidos (*Stop*>Gln) onde o

códon de parada é encontrado no novo códon 173. É uma Hb encontrada comumente no Sudeste Asiático e entre os chineses. A associação de Hb CS com α^0 -talassemia conduz a uma síndrome talassêmica, comumente encontrada na região (JOMOUI *et al.*, 2015).

Lin e colaboradores em 2011 relataram um caso de Hb Stanleyville- II em combinação com Hb Constant Spring (Hb CS) em uma mulher chinesa. No ambulatório médico, do Departamento de Ginecologia do Hospital Central de Chaozhou, Província de Guangdong, uma mulher de 37 anos de idade apresentava um quadro de anemia, com hemoglobina de 6,6 g / dL, MCV 58,0 fl e MCH 16,6 pg, sem esplenomegalia. O sangue foi analisado por cromatografia líquida automatizada de alto desempenho e a percentagem da variante Hb foi de 27,53%, Hb A2 0,67%, Hb CS 0,8% e Hb A 71,0%. Os genes α -talassemia 1 (tipo SEA) e α -talassemia 2 ($-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$) foram amplificados pela técnica da Polimerase de reação em cadeia (GAP-PCR) e os resultados para α -talassemia foram normais. Mesmo a Hb CS tendo sido identificada na paciente, pela técnica de *reverse dot blots* (RDB) para investigar os 3 tipos conhecidos de mutações chinesas, os dois genes de α -globina ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) foram amplificados por PCR e o sequenciamento genético foi realizado. O sequenciamento do gene $\alpha 1$ -globina revelou uma substituição de AAC → AAA no códon 78 (asparagina para a lisina), indicando a presença de Hb Stanleyville II e uma substituição de TAA → CAA no códon 142 foi encontrada no gene $\alpha 2$ -globina, que constatou o diagnóstico de Hb CS (LIN *et al.*, 2011).

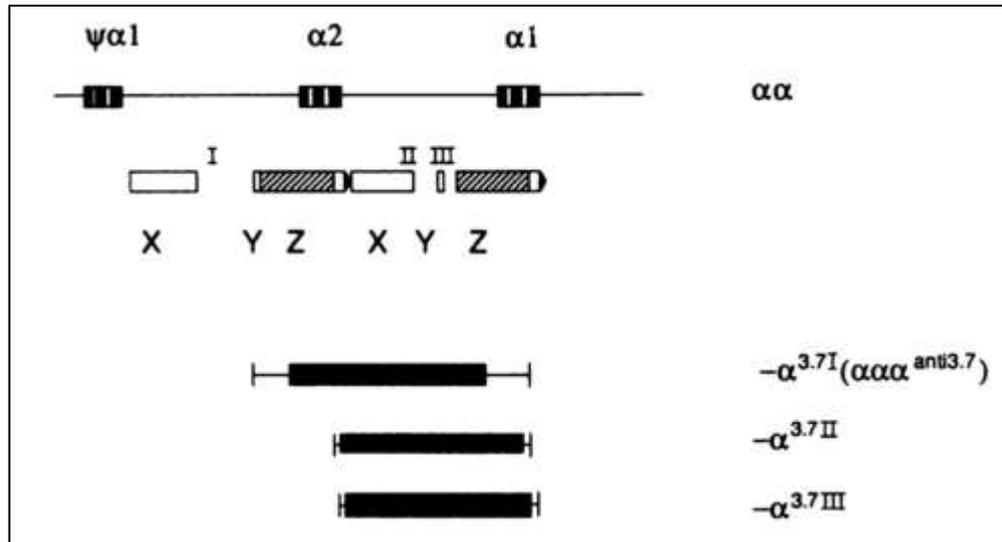
1.9 Talassemia alfa

A α -talassemia (α -Tal) é a doença monogênica mais comum no mundo e é caracterizada por uma redução ou ausência completa de expressão do gene α -globina. Os indivíduos normais possuem dois genes alfa em cada cromossomo 16p13.3 ($\alpha^2\alpha^1/ \alpha^2\alpha^1$) e 95% da α -talassemia reconhecida, envolve a deleção de um ou ambos os genes da α -globina (HIGGS *et al.*, 1989; WEATHERALL, 1989).

Os genes da α -globina estão inseridos dentro de duas unidades de duplicação altamente homólogas, cuja identidade da sequência parece ter sido mantida ao longo da evolução através de eventos de crossover desiguais. Essas regiões são divididas

em subsegmentos homólogos representados pelas letras X, Y e Z, enquanto os elementos não homólogos são representados pelos números I, II e III. (Figura 4).

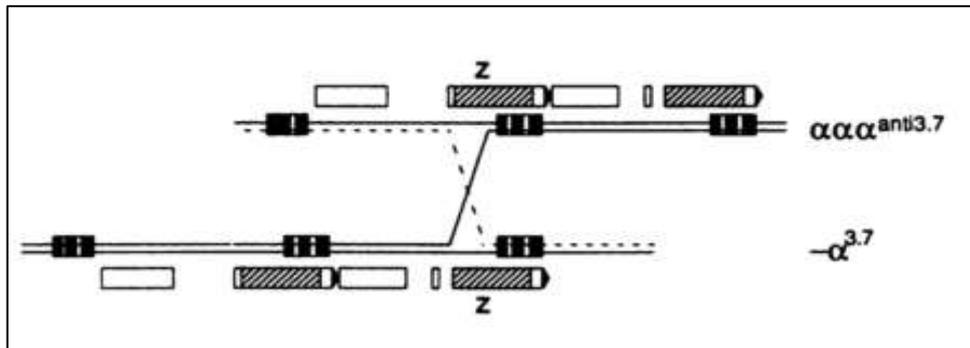
Figura 4 – Representação das regiões homólogas X, Y, Z e não homólogas I, II, III.



Legenda: A barra sólida representa a extensão produzida por cada deleção $-\alpha^{3.7}$.
Fonte: HIGGS *et al.*, 1989 (adaptado).

As deleções que removem um gene da α -globina são resultado da recombinação não homóloga entre cromossomos alinhados desigualmente durante a meiose. A recombinação recíproca entre os segmentos Z produz um cromossomo com somente um gene α funcional (deleção $-\alpha^{3.7}$ ou deleção à direita) que causa a α -talassemia e o outro cromossomo com 3 genes α ($\alpha\alpha^{anti3.7}$), que não está associado a manifestações clínicas e laboratoriais talassêmicas (Figura 5). Nessa recombinação perde-se um fragmento de 3.7kb que inclui a porção 3' final do gene $\alpha 2$, a região intergênica $\alpha 2$ - $\alpha 1$ e a porção 5' inicial do gene $\alpha 1$, formando um gene híbrido com a porção inicial de $\alpha 2$ e a final de $\alpha 1$. Esses eventos podem ser subdivididos, dependendo do exato local dentro do segmento Z em que a recombinação ocorre em $-\alpha^{3.7I}$, $-\alpha^{3.7II}$ e $-\alpha^{3.7III}$ (CHUI; FUCHAROEN; CHAN, 2003; HIGGS *et al.*, 1989).

Figura 5 – Esquema da recombinação recíproca entre os segmentos Z produzindo deleção $-\alpha^{3.7}$ ou deleção à direita.

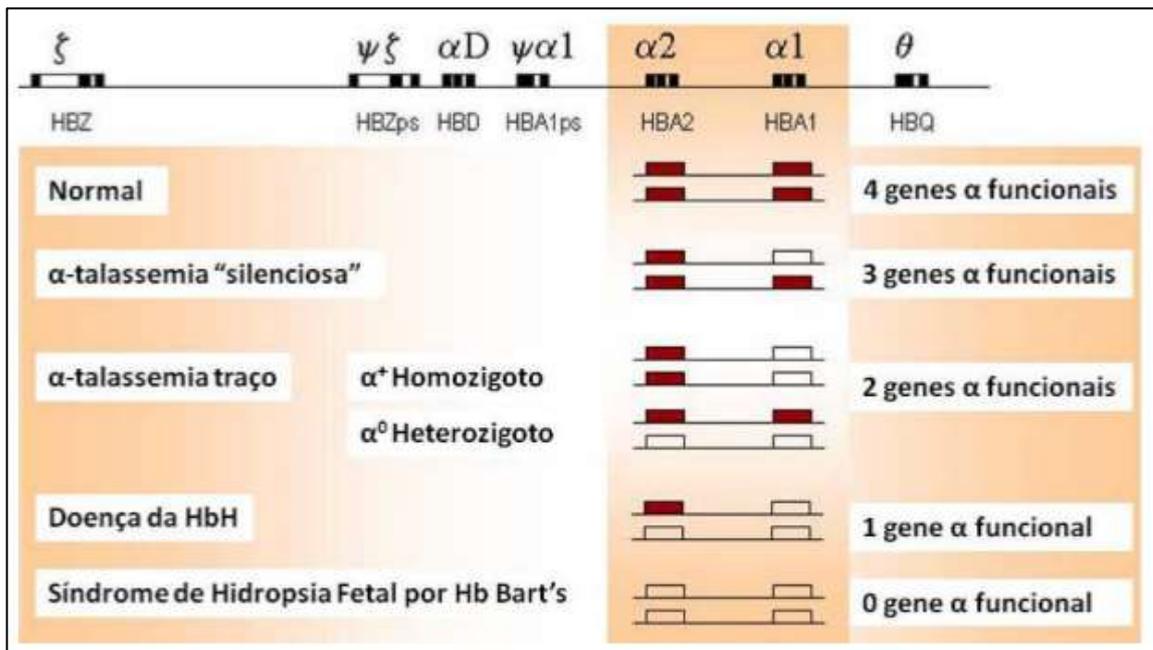


Fonte: HIGGS *et al.*, 1989 (adaptado).

A inativação de apenas um gene alfa denomina-se talassemia α^+ e quando os dois genes estão afetados designa-se talassemia α^0 . Do ponto de vista clínico, existem três formas de talassemia alfa. Na primeira, o traço talassêmico α que envolve a deleção de um ou dois genes α , a segunda é a doença da Hb H onde três genes α são afetados, e a terceira é a síndrome da hidropsia fetal onde os quatro genes α são afetados (CANÇADO, 2006).

O traço talassêmico α^+ heterozigoto ($-\alpha/\alpha\alpha$), também denominado portador silencioso, resulta em uma forma de talassemia praticamente assintomática e com alterações laboratoriais mínimas ou ausentes, dificultando o seu diagnóstico por técnicas laboratoriais convencionais, ao contrário do traço talassêmico α^+ homozigoto e o traço talassêmico α^0 heterozigoto, que, respectivamente, correspondem à perda de dois genes alfa ($-\alpha/-\alpha$ e $--/\alpha\alpha$) e caracterizam-se por apresentar um quadro de microcitose e hipocromia (Figura 6) (CANÇADO, 2006).

Figura 6 – Classificação com alterações dos genes da talassemia alfa e expressões fenotípicas.



Fonte: HARTEVELD; HIGGS, 2010 (adaptado).

As deleções mais comuns são a $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ que deletam um único gene. Já as deleções de genes duplos $-\text{SEA}$ e $-\text{FIL}$ são características do Sudeste Asiático enquanto as deleções $-\text{MED}$ e $-\text{20.5}$ estão mais presentes no Mediterrâneo. Embora tenha sido relatada em Taiwan, uma alta incidência de deleção $-\text{THAI}$, foi sugerido que estes pacientes possuíam a mutação $-\text{FIL}$, com exceção do paciente original com esta mutação, outros não foram descritos, e a frequência do alelo é desconhecida (CHONG *et al.*, 2000).

Alguns trabalhos realizados em diversos estados brasileiros descrevem frequências variáveis entre 20 - 50% de indivíduos portadores da deleção $-\alpha^{3.7}$. Estudos de base populacional relatam frequências de α^+ - talassemia decorrente da deleção $-\alpha^{3.7}$, com números próximos a 20% (ADORNO *et al.*, 2005; SONATI *et al.*, 1991; SOUZA *et al.*, 2009).

Outro estudo realizado com o objetivo de verificar a presença de talassemia alfa em portadores de hemoglobina S em heterozigose (Hb AS) com quadro anêmico, revelou que das 1002 mostras de sangue analisadas, 16 (1,59%) delas apresentaram esta associação (TOMÉ-ALVES *et al.*, 2000).

Foi observada também a frequência de talassemia alfa (deleção $-\alpha^{3,7}$) em 49,9% de indivíduos com microcitose e hipocromia sem anemia. Foram analisados 339 adultos do ambulatório do Hospital Universitário da Unicamp (com exceção das clínicas ambulatoriais de Hematologia Clínica), que apresentaram níveis normais de hemoglobina (Hb) e redução do volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média. Noventa e oito eram negros (28,9%) e 241 eram caucasianos (71,1%). Em todos os casos os níveis de Hb A2 e F eram normais ou baixos. Esses resultados, com importante relevância clínica, demonstraram que a α -talassemia, principalmente através da deleção $-\alpha^{3,7}$, é uma causa importante de microcitose e hipocromia em indivíduos sem anemia, onde muitas vezes, equivocadamente, são interpretados como indicadores de deficiência de ferro (BORGES *et al.*, 2001).

2. OBJETIVO GERAL

Identificar pela metodologia de sequenciamento genético de hemoglobinas de comportamento físico-químico semelhantes ao da hemoglobina S (*S-like*) de pacientes triados do Programa Nacional de Triagem Neonatal do estado do Rio de Janeiro.

2.1 Objetivos Específicos

Verificar a presença da talassemia alfa em associação com as hemoglobinas *S-like* do estudo.

Determinar a localização, da variante no gene $\alpha 2$, $\alpha 1$ ou no gene híbrido em casos de deleção talassêmica, nos casos onde houver variantes da cadeia alfa-globina.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1 População Alvo

A população estudada faz parte do banco de dados do Programa de Triagem Neonatal do estado do Rio de Janeiro, trata-se de crianças que na sua investigação para Doença Falciforme (DF), obtiveram resultados de uma Hb variante indeterminada, na janela da Hb S (*S-Window*) pela metodologia de HPLC com o equipamento ULTRA 2™ e o kit *Ultra Screening Genesys* (*Trinity Biotech, Jamestown, NY*), no Instituto de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (Hemorio).

Foram selecionadas 17 amostras para o estudo obtidas com sangue total, coletadas em EDTA. O tamanho amostral foi definido levando em consideração um estudo epidemiológico realizado no próprio Hemorio, onde foram analisadas amostras de sangue de 1.217.833 neonatos e dessas amostras, o diagnóstico para hemoglobinopatias de 314 não foram conclusivas (LOBO *et al.*, 2014). Com o uso da ferramenta *OpenEpi* versão 3.01, que é um programa gratuito com código aberto para estatísticas epidemiológicas (disponível em: <<http://www.openepi.com/Menu/OE>>) e os dados do estudo citado, foi obtido o tamanho amostral para a frequência em uma população (Tabela 1).

Tabela 1 - Tamanho da amostra para a frequência em uma população

Tamanho da população (para o fator de correção da população finita ou <i>fcp</i>) (<i>N</i>):	1217833
Frequência % hipotética do fator do resultado na população (<i>p</i>):	0.3%+/-5
Limites de confiança como % de 100(absoluto +/-%) (<i>d</i>):	5%
Efeito de desenho (para inquéritos em grupo- <i>EDFF</i>):	1
Tamanho da Amostra (<i>n</i>) para vários Níveis de Confiança	

IntervaloConfiança (%)	Tamanho da amostra
95%	5
80%	2
90%	4
97%	6
99%	8
99.9%	13
99.99%	19

Equação	
Tamanho da amostra $n = [EDFF * Np (1-p)] / [(d^2 / Z^2_{1-\alpha/2} * (N-1) + p*(1-p)]$	
Fonte: disponível em: < http://www.openepi.com/Menu/OE >	

3.1.1 Critérios de inclusão

Pacientes do banco de dados do PNTN-RJ do HEMORIO que continham na sua investigação para DF, resultado de Hb variante indeterminada, em *S-window* pela metodologia de HPLC pelo equipamento utilizado no Instituto, durante o período de seleção de amostras.

3.1.2 Critérios de exclusão

Responsáveis que não desejaram a participação da criança no estudo.

3.2 **Questões éticas**

Este projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (Hemorio), sob o número 405/16 e apresentado de acordo com as determinações éticas da resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS/CONEP) (Anexo A). A confidencialidade e privacidade dos pacientes foram preservadas. Os responsáveis legais receberam esclarecimentos a respeito do objetivo do estudo e dos procedimentos necessários para a participação na pesquisa. A obtenção das amostras e o preenchimento do instrumento de coleta de dados (Apêndice A) somente foi realizada após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice B) pelo responsável, ficando o mesmo com uma cópia do TCLE.

O projeto, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (Hemorio) sob o parecer número: 1.820.98 / CAAE: 61993416.7.0000.5267 (Anexo B).

3.3 Diagnóstico de Hemoglobinopatias no Rio de Janeiro

No HEMORIO, desde a implantação do programa, a técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foi a metodologia de escolha para a triagem de hemoglobinopatias. Durante o período do estudo, as amostras do PNTN-RJ estavam sendo analisadas no equipamento com metodologia de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Resolução) ULTRA 2™ com o kit *Ultra Screening Genesys* (Trinity Biotech, Jamestown, NY).

Nos casos de confirmação de doença falciforme, a amostra biológica é encaminhada para um laboratório para testagem pela metodologia de biologia molecular. A prova de solubilidade de ditonito de sódio, utilizado para verificar a presença da hemoglobina S, nos casos suspeitos de hemoglobinas *S-like*, é realizado durante o estudo familiar. Esse teste, é realizado no progenitor, onde foi identificada a hemoglobina variante. O resultado negativo exclui a possibilidade de traço falcêmico.

3.4 Obtenção de amostras e Fluxograma do Estudo

Inicialmente foram selecionadas de forma aleatória e anônima, 11 amostras de sangue coletadas em papel filtro a partir do banco de dados da triagem neonatal do Hemorio, ou seja, os resultados para hemoglobinopatias nos cromatogramas, sinalizavam a presença de uma hemoglobina em *S-window*. Essas amostras correspondiam aos recém-nascidos, que já haviam retornado ao Instituto para confirmar a presença da hemoglobina variante. Desta forma, os tubos com sangue coletados em EDTA não estavam mais disponíveis, pois os testes necessários à confirmação da variante já haviam sido realizados. As amostras de sangue coletadas em papel filtro utilizadas nos programas de triagem neonatal, não eram adequadas para o isolamento do DNA.

Diante deste fato, para dar continuidade a pesquisa, era necessário que as amostras de sangue colhidas em tubos das próximas crianças selecionadas para o estudo, fossem separadas quando as mesmas retornassem ao Instituto a fim de

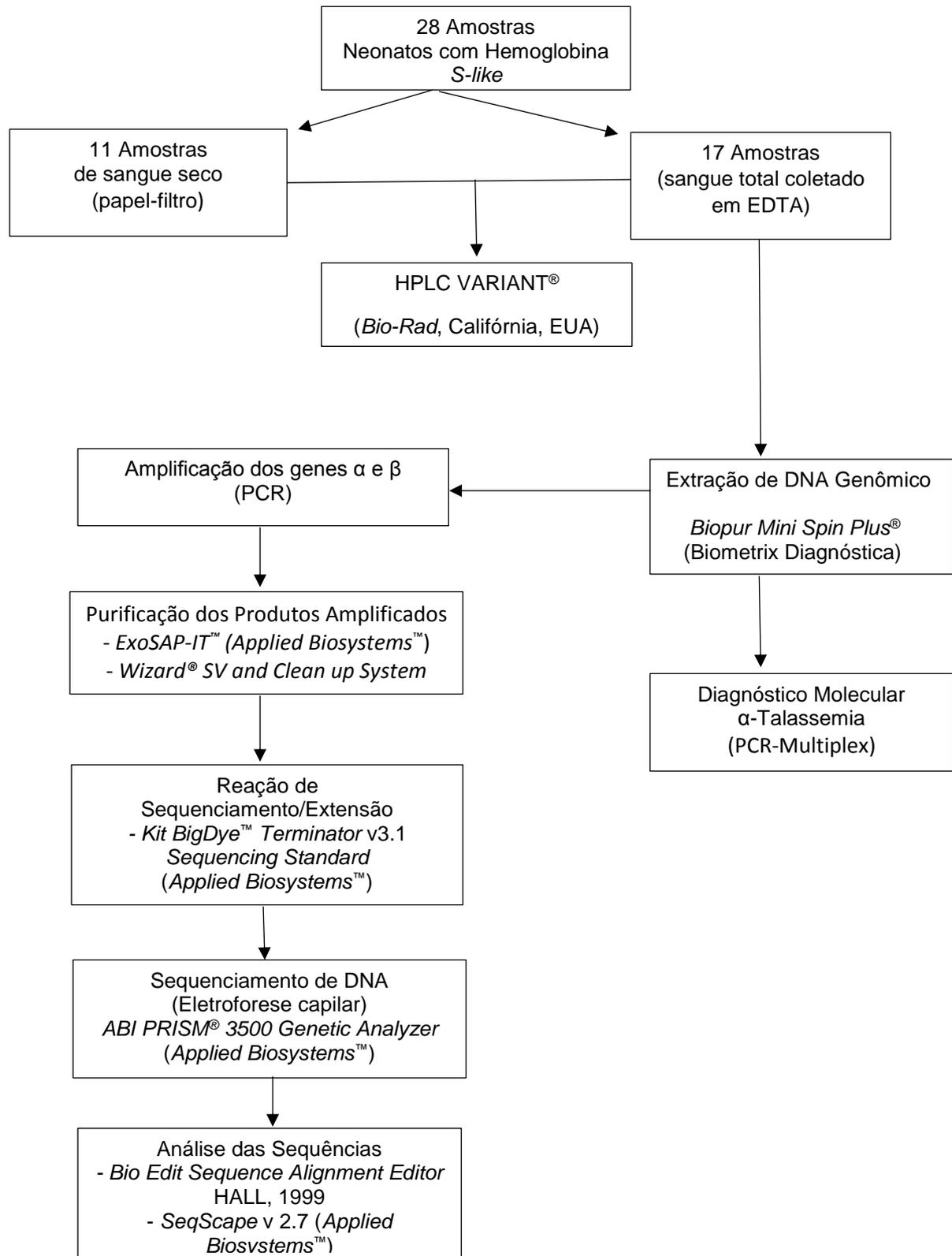
confirmar a presença da hemoglobina variante. Esta fase de seleção foi realizada de 22 de outubro de 2016 até 01 de fevereiro de 2017, quando o Hemório deixava de ser o responsável pelo PNTN-RJ, seguindo então, o estudo com 17 participantes, que possuíam amostras de sangue total, coletadas em EDTA.

Com as amostras selecionadas, as mesmas foram submetidas no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LACFAR/UFRJ), conforme compromisso anteriormente firmado (Anexo C), à determinação e quantificação das hemoglobinas normais e variantes utilizando o sistema automatizado VARIANT® (*Bio-Rad*, Califórnia, EUA) pela metodologia Cromatografia Líquida de Alta performance (HPLC) com o kit β -*Thalassemia Short* (*Bio-Rad*, Califórnia, EUA). As 28 amostras de sangue, sejam coletadas em papel filtro ou em tubos com EDTA, foram analisadas pela metodologia de HPLC. No LACFAR também foram executadas as etapas de extração de DNA genômico de sangue periférico com o kit comercial Biopur Mini Spin Plus (Biometrix Diagnóstica) e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR Multiplex) no termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) para estudo molecular das principais deleções da talassemia alfa (- $\alpha^{3.7}$, - $\alpha^{4.2}$, - $\alpha^{20.5}$, --^{SEA} e -^{MED}).

No laboratório de Genética do Instituto de Biologia do Exército (IBEx), conforme autorização prévia (Anexo D), foram realizadas as etapas de reação de amplificação das cadeias alfa e beta globina, seguida da purificação desses produtos pelas enzimas Exonuclease I (New England BioLabs, *Massachusetts*, EUA) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) (*Promega Corporation*, *Madison*, EUA). Os produtos purificados, serviram de moldes para as reações de sequenciamento (*BigDye™ Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit* (*Applied Biosystems™*) e consequente obtenção das sequências de nucleotídeos por eletroforese capilar (ABI PRISM® 3500 *Genetic Analyser*) (*Applied Biosystems™*).

As sequências obtidas da eletroforese foram inseridas na ferramenta *Bio Edit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999) e as mesmas comparadas as sequências do banco de dados de hemoglobinas no *Globin Gene Server* (disponível em: <http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar>).

Figura 7 - Fluxograma representativo do estudo



Fonte: O Autor, 2017

3.5 Análise do Perfil de Hemoglobinas por HPLC

A determinação e quantificação das hemoglobinas normais e variantes foram realizadas utilizando o sistema automatizado *VARIANT*® (BIO-RAD, Califórnia, EUA) e o kit comercial *β-Thalassemia Short* (Bio-Rad, Califórnia, EUA). Para a análise em Cromatografia Líquida de Alta performance (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*), uma alíquota de 5 µL de sangue periférico das amostras coletadas em EDTA, foi diluída em 1 mL de tampão específico do kit utilizado. Para as amostras de sangue seco coletadas em papel filtro foram obtidos 2 a 3 picotes de 5 mm cada e colocadas em microtubo de 1,5 mL com 1,0 mL de solução tampão de eluição contendo fosfato de sódio, fornecida pelo fabricante. Essa solução foi incubada em temperatura ambiente por 90 minutos e misturada por inversão do microtubo, em seguida foram retirados os discos e as amostras foram submetidas as análises.

O kit comercial *β-Thalassemia Short* utiliza os princípios da cromatografia líquida de alta performance (HPLC) por troca catiônica. As amostras hemolisadas são mantidas a 12 ± 2 °C no mostrador automático. As amostras são sequencialmente injetadas no fluxo de análise em intervalos de 6,5 minutos. Duas bombas de pistão duplo e um gradiente pré-programado controlam a mistura do tampão de eluição que passa pela coluna analítica. A concentração iônica da mistura do tampão de eluição é aumentada pela elevação da contribuição percentual do segundo tampão de eluição. Conforme a concentração iônica da mistura aumenta, mais hemoglobinas fortemente retidas eluem da coluna analítica. Um fotômetro de filtro com comprimento de onda duplo (415 e 690 nm) monitora a eluição das hemoglobinas da coluna, detectando as alterações da absorbância a 415 nm e o filtro secundário de 690 nm corrige a linha de base para efeitos causados pela mistura de tampões com concentrações iônicas diferentes. As alterações na absorbância são monitoradas e exibidas como um cromatograma de absorbância versus tempo. O tempo de retenção é o tempo transcorrido desde a injeção da amostra até o ápice de um pico de hemoglobina e cada hemoglobina tem um tempo de retenção característico. Os resultados foram fornecidos nas formas de gráficos (cromatograma), com o percentual de cada pico de hemoglobina identificado (Hb A, Hb A2, Hb F e Hemoglobinas variantes)(*BIO-RAD*, 2006).

3.6 Isolamento de DNA Genômico do Sangue Periférico

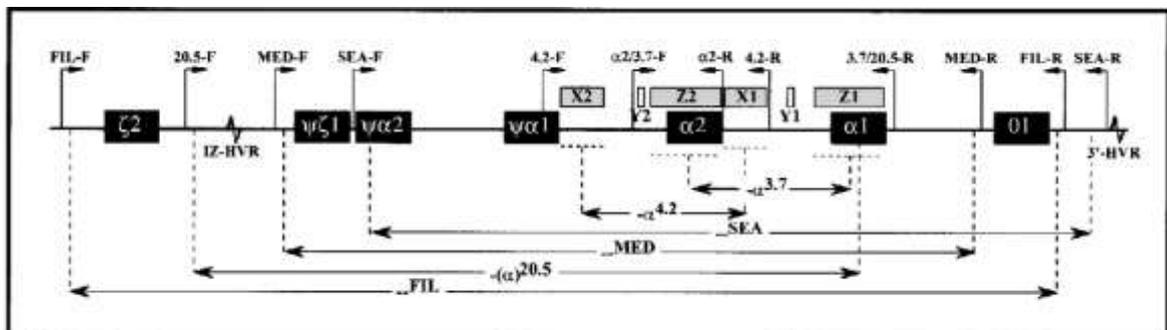
A extração do DNA do sangue periférico dos pacientes foi realizada utilizando o kit comercial Biopur Mini Spin Plus (Biometrix Diagnóstica), seguindo as recomendações do fabricante. Uma alíquota de 200 μL de sangue total coletado em EDTA foi previamente homogeneizada e transferida para um microtubo de 1,5 mL. A essa alíquota foram adicionados 20 μL da enzima Proteinase K e 200 μL do Tampão de Lise. Esse microtubo foi incubado a 56° C durante 15 minutos, para permitir que com a lise celular houvesse a liberação DNA genômico na solução. Durante a incubação o material foi submetido cinco vezes à agitação em vortex para auxiliar no processo de lise celular. Ao microtubo foi então adicionado Tampão de Ligação, e o conteúdo foi novamente homogeneizado. O Tampão de ligação propicia a ligação do DNA genômico à membrana de sílica da coluna de extração contida no kit. Em seguida essa coluna foi lavada com tampões de lavagem distintos, que apresentavam concentração de álcool etílico decrescentes. Essa etapa tinha como objetivo remover sais residuais e impurezas residuais, preparando o DNA para posterior eluição em tampão específico. A eluição foi realizada em 200 μL de tampão específico pré-aquecido a 56° C. O DNA genômico obtido após a última etapa, foi alíquotado em 2 microtubos para preservação do mesmo e foi mantido armazenado a - 20° C, até sua utilização para os estudos dos genes alfa e beta globina, bem como o diagnóstico molecular da talassemia alfa. A concentração de DNA genômico após a extração varia entre 100 e 200 ng/ μL .

3.7 Diagnóstico Molecular da Talassemia alfa (PCR Multiplex)

O diagnóstico molecular da talassemia alfa foi realizado utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), multiplex. Para a reação PCR multiplex foram investigadas as deleções - $\alpha^{3,7}$, - $\alpha^{4,2}$, - $\alpha^{20,5}$, --SEA e --MED e para amplificar a junção dos fragmentos gerados pelas deleções -- $\alpha^{3,7}$, -- $\alpha^{4,2}$, - $\alpha^{20,5}$, --SEA, --MED e o gene $\alpha 2$ -globina não deletado (gene híbrido) utilizou-se os iniciadores (*primers*) descritos previamente por Chong e colaboradores (Figura 8) (CHONG *et al.*, 2000). A

amplificação do gene $\alpha 2$ foi utilizada como indicativo de heterozigose quando uma deleção alélica estava presente. Para cada conjunto de reações foram incluídos controles positivo heterozigoto del - $\alpha^{3.7}$ e negativo. Cada 25 μ L de reação de PCR continha 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8,4), 50 mmol/L KCl, 2,0 mmol/L $MgCl_2$, 1,0 mol/L betaína (*Sigma-Aldrich*), 0,5 mmol/L de cada dNTP, 15 pmoles de cada iniciador específico para as deleções testadas (Tabela 2), 2,5 unidades de *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen, *Life Technologies*, Califórnia, EUA) e 100-200 ng de DNA genômico. Os iniciadores utilizados encontram-se descritos na Tabela 2. A reação em cadeia da polimerase foi realizada em termociclador *Veriti*[®] (*Applied Biosystems*, Califórnia, EUA) com 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C, 30 ciclos de 98°C por 45 segundos para desnaturação, 63°C para o anelamento dos iniciadores por 90 segundos, 72°C por 135 segundos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Figura 8 - Representação esquemática do cluster de genes α -globina. A figura indica extensões de cada deleção representada no ensaio de multiplex-PCR e posições relativas dos primers.



Fonte: *Chong et al.*, 2000 (adaptado)

Tabela 2 – Sequência dos iniciadores utilizados no diagnóstico molecular da talassemia alfa

Iniciadores	Sequência 5'→ 3'	Tamanho Produto PCR
α2/3.7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	Junção do fragmento -α ^{3.7}
3.7/20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	2022/2029 pb
α2/3.7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	Gene α2
α2-R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	1800 pb
4.2-F	GGTTTACCCATGTGGTGCCTC	Junção do fragmento -α ^{4.2}
4.2-R	CCCGTTGGATCTTCTCATTTCCC	1628 pb
SEA-F	CGATCTGGGCTCTGTGTTCTC	Junção do fragmento - ^{SEA}
SEA-R	AGCCCACGTTGTGTTTCATGGC	1349 pb
20.5-F	GCCCAACATCCGGAGTACATG	Junção do fragmento - (α) ^{20.5}
3.7/20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	1007 pb
MED-F	TACCCTTTGCAAGCACACGTAC	Junção do fragmento - ^{MED}
MED-R	TCAATCTCCGACAGCTCCGAC	807 pb

Legenda: pb – pares de base

Fonte: Chong *et al.*, 2000 (adaptado)

Para visualização dos produtos da PCR foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1% (*UltraPure™* Agarose, Invitrogen). Alíquotas de 15 µL de cada produto foram aplicadas no gel sendo submetidas à corrida eletroforética a 120 V durante 80 minutos. Foi aplicado ao lado das amostras, 2µL do marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* [10mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA] (Invitrogen, *Life Technologies*, Califórnia, EUA), a fim de determinar os tamanhos dos fragmentos amplificados.

Ao final da eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (5 µg/mL) em TBE 1X durante 15 minutos, e os fragmentos amplificados foram observados sob luz ultravioleta.

3.8 Amplificação do Gene Alfa Globina pela Reação de Cadeia da Polimerase

O diagnóstico molecular da talassemia alfa foi de fundamental importância para o estudo do gene da alfa globina, pois a seleção de iniciadores estava diretamente ligada a presença de deleção alfa talassêmica.

Para a amplificação (PCR) dos genes HBA1, HBA2 e o gene híbrido foram utilizados os iniciadores descritos na tabela 3 (CHONG *et al.*, 2000; ZORAI *et al.*, 2002). Os iniciadores desenhados por Chong e colaboradores (2000) produziam fragmentos grandes compreendendo HBA2 para serem sequenciados, desta forma a utilização do iniciador S1 em combinação com o iniciador $\alpha 2R$ produziram um fragmento com tamanho suficiente para o sequenciamento de HBA2.

As condições para realização da PCR continham 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8,4), 50 mmol/L KCl, 2,0 mmol/L MgCl₂, 1,0 mol/L betaína (*Sigma-Aldrich*), 0,5 mmol/L de cada um dos dNTP's, 15 pmoles de cada iniciador, 2,5 U de *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen, *Life Technologies*, Califórnia, EUA) e 100 - 200 ng de DNA genômico para 25 μ L de volume final. A reação em cadeia da polimerase foi realizada em termociclador Veriti™ (*Applied Biosystems*, Califórnia, EUA) com 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C, 30 ciclos de 98°C por 45 segundos para desnaturação, 63°C para o anelamento dos iniciadores por 90 segundos, 72°C por 135 segundos, uma extensão final a 72°C por 5 minutos e mantidos a 4°C após o término da reação. A utilização dos iniciadores, apenas para a deleção talassêmica tipo $-\alpha^{3.7}$ nesta etapa do estudo, é justificada pois dentre os pacientes participantes só essa deleção foi encontrada.

Tabela 3 – Iniciadores utilizados para amplificação do gene HBA

Iniciadores	Sequência 5'→3'
$\alpha 2/3.7F$	CCCCTCGCCAAGTCCACCC
$\alpha 2-R$	AGACCAGGAAGGGCCGGTG
3.7/20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG

Fonte: CHONG *et al.*, 2000 (Adaptado).

A ferramenta *primer-blast* foi utilizada para encontrar primers específicos para cada modelo de PCR aplicado no estudo (disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>>).

3.9 Amplificação do Gene Beta Globina pela Reação de Cadeia da Polimerase

No braço curto do cromossomo 11 está localizado o cluster do gene da beta globina com a subunidade HBB contendo 1606 pb. Para a amplificação da subunidade beta pela metodologia da reação em cadeia da polimerase, foram utilizados os iniciadores descritos na tabela 4 (CHINCHANG *et al.*, 2005).

Para a amplificação do gene HBB foram utilizados tampão da enzima 1x, fornecido pelo fabricante, 10x PCR *Buffer* – Mg [(200 mM Tris HCl (pH 8.4), 500 mM KCl)], 3,0 mM de MgCl₂, dNTP's (0,2 mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos), 0,2 µM de cada iniciador, 0,75 U de *Platinum™ Taq DNA polymerase* (INVITROGEN) e 100 - 200 ng de DNA para um volume final de 50 µL de reação. A reação da PCR foi realizada em termociclador *Veriti™* (*Applied Biosystems*, Califórnia, EUA), com 5 minutos a 95°C para desnaturação inicial da fita de DNA e 35 ciclos consistindo de 30 segundos a 94°C para desnaturação, 60 segundos a 58°C de anelamento para os iniciadores, 102 segundos a 72°C para reação de extensão, uma extensão final a 72°C por 5 minutos e mantido a 4°C ao final da reação.

Tabela 4 – Iniciadores utilizados para amplificação do gene HBB

Iniciadores	Sequência 5'→3'
BGPL	AAGAGCCAAGGACAGGTAC
BGEX 3R	CCCCAGTTTAGTAGTTGGACTTAG

Fonte: CHINCHANG *et al.*, 2005 (Adaptado).

3.10 Purificação dos Produtos pós-PCR

As amostras dos pacientes que na sua investigação molecular não havia deleção alfa talassêmica do tipo - $\alpha^{3.7}$ foram submetidas inicialmente a purificação enzimática. Foram misturados previamente 2,5µL de Exonuclease I 20.000U/mL (New England BioLabs, *Massachusetts*, EUA) com 50µL de *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) (*Promega Corporation*, *Madison*, EUA). Posteriormente, 5µL do produto de

reação pós-PCR com 2 μL de reagente (2,5 μL de Exonuclease I + 50 μL SAP , Água ultrapura q.s.p. 100 μL) para um volume de reação total de 7 μL . A mistura foi incubada em termociclador *Veriti™* (*Applied Biosystems™*, Califórnia, EUA), a 37°C durante 15 minutos para degradar primers e nucleotídeos remanescentes, seguida por mais 15 minutos a 80°C para inativar as enzimas.

Para os pacientes com a deleção alfa talassêmica do tipo $-\alpha^{3,7}$, as amostras dos mesmos foram submetidas a purificação do produto pós-PCR com o kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (*Promega Corporation, Madison, EUA*), seguindo as normas técnicas do fabricante.

A escolha desse sistema permite a purificação de fragmentos de DNA dos produtos amplificados da PCR, a partir da fatia de gel de agarose após a eletroforese em tampão de Tris-Borato-EDTA (TBE) ou Tris-Acetato-EDTA (TEA). O fragmento de interesse é excisado do gel e dissolvido em solução de isotiocianato de guanidina (*Membrane Binding Solution*). A técnica para utilizada nesse sistema baseia-se na capacidade que o DNA tem de se ligar às superfícies das membranas de sílica na presença de sais caotrópicos (sais que, em solução aquosa, são capazes de romper as ligações de hidrogênio entre moléculas de água) com posterior eluição em água.

3.11 Reação de Sequenciamento e Eletroforese Capilar

Os produtos amplificados e purificados dos genes alfa e beta globina, após a reação em cadeia da polimerase são utilizados como matriz para a reação de sequenciamento Sanger com kit *BigDye™ Terminator Cycle v3.1 Sequencing Standard* (*Applied Biosystems™*), seguindo as normas técnicas do fabricante.

Foram misturados para cada reação de extensão 1,5 μL de tampão de diluição fornecido pelo fabricante, 3,2 pmoles do iniciador relativo a sequência a ser analisada, 1 μL de *BigDye™ Terminator Cycle v3.1 Sequencing Standard* (*Applied Biosystems™*), 2 μL de produto de PCR purificado e água ultrapura para um volume final de 10 μL . A reação foi submetida ao termociclador *Veriti™* (*Applied Biosystems™*, Califórnia, EUA) por 2 minutos a 96°C, seguido de 35 ciclos de 15 segundos a 96°C, 9 segundos a 50°C, 2 minutos a 60°C e uma extensão final de 10 minutos a 60°C. Após o término

da reação a solução é mantida a 4°C. Os iniciadores utilizados nos protocolos de sequenciamento estão descritos nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Iniciadores utilizados para as reações de sequenciamento dos genes HBA.

Iniciadores	Sequência 5'→3'
S1	CACAGACTCAGAGAGAACC
α 2-R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG
3.7/20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG

Fonte: CHONG *et al.*, 2000; ZORAI *et al.*, 2002 (Adaptado).

Tabela 6 - Iniciadores utilizados para as reações de sequenciamento do gene HBB

Região	Iniciadores	Sequência 5'→3'	Tamanho do Produto
Promotora	BGPL	AAGAGCCAAGGACAGGTAC	
Exon 2	BGEX 2.2R	AACATCAAGCGTCCCATAG	662 pb
Intron 2	BGInt 2L	GCTAATCATGTTCATACCTC	
Exon 3	BGEX 3R	CCCCAGTTTAGTAGTTGGACTTAG	456 pb

Fonte: CHINCHANG *et al.*, 2005 (Adaptado).

Finalizando, uma segunda purificação com filtração em gel utilizando a resina *Sephadex*[™] G-50, seguindo as recomendações técnicas do fabricante (*GE Healthcare Bio-Science, Uppsala, Suécia*), foi realizada com o objetivo de remover possíveis contaminantes através da dessalinização de biomoléculas com alto peso molecular que ficam aderidas à resina durante as centrifugações, passando pela resina, apenas o material genético.

O preparo da solução com *Sephadex*[™] G-50 consiste em adicionar 3,3 gramas da resina em 50mL de água ultrapura. Adicionar 700 μ L da referida solução a uma coluna com filtro de celulose regenerada (*QIAGEN, Hilden, Alemanha*), centrifugar durante 3 minutos a 2.000 g. Descartar o filtrado e acrescentar todo o volume do produto de extensão purificado na etapa anterior sobre a resina seca no interior da coluna. Por fim, centrifugar durante 1 minuto à 1.000 g.

Em seguida, as amostras foram conduzidas ao Sequenciador de DNA por eletroforese capilar *ABI PRISM*[®] 3500 *Genetic Analyser (Applied Biosystems*[™]), o qual

permite a análise das sequências de nucleotídeos dos produtos amplificados dos genes de alfa e beta globinas presentes nas amostras. Os dados obtidos na etapa do sequenciamento foram analisados nos programas *Bio Edit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999) e *SeqScape v 2.7 (Applied Biosystems™)*.

4. RESULTADOS

Dentre as vinte e oito amostras submetidas a cromatografia líquida de alta performance no equipamento *VARIANT*[®] com o kit comercial *β-Thalassemia Short* (*Bio-Rad*, Califórnia, EUA), onze delas utilizadas a partir da coleta com sangue seco em papel filtro, não produziram cromatogramas satisfatórios. Os picos não ficaram bem definidos, com suas linhas de base fora dos padrões para as análises.

As outras dezessete amostras, obtidas a partir do sangue total coletadas em EDTA, produziram gráficos satisfatórios revelando os seguintes perfis de Hb F, Hb A₀, Hb A₂ e Hb variantes (Tabela 7 e Figura 9).

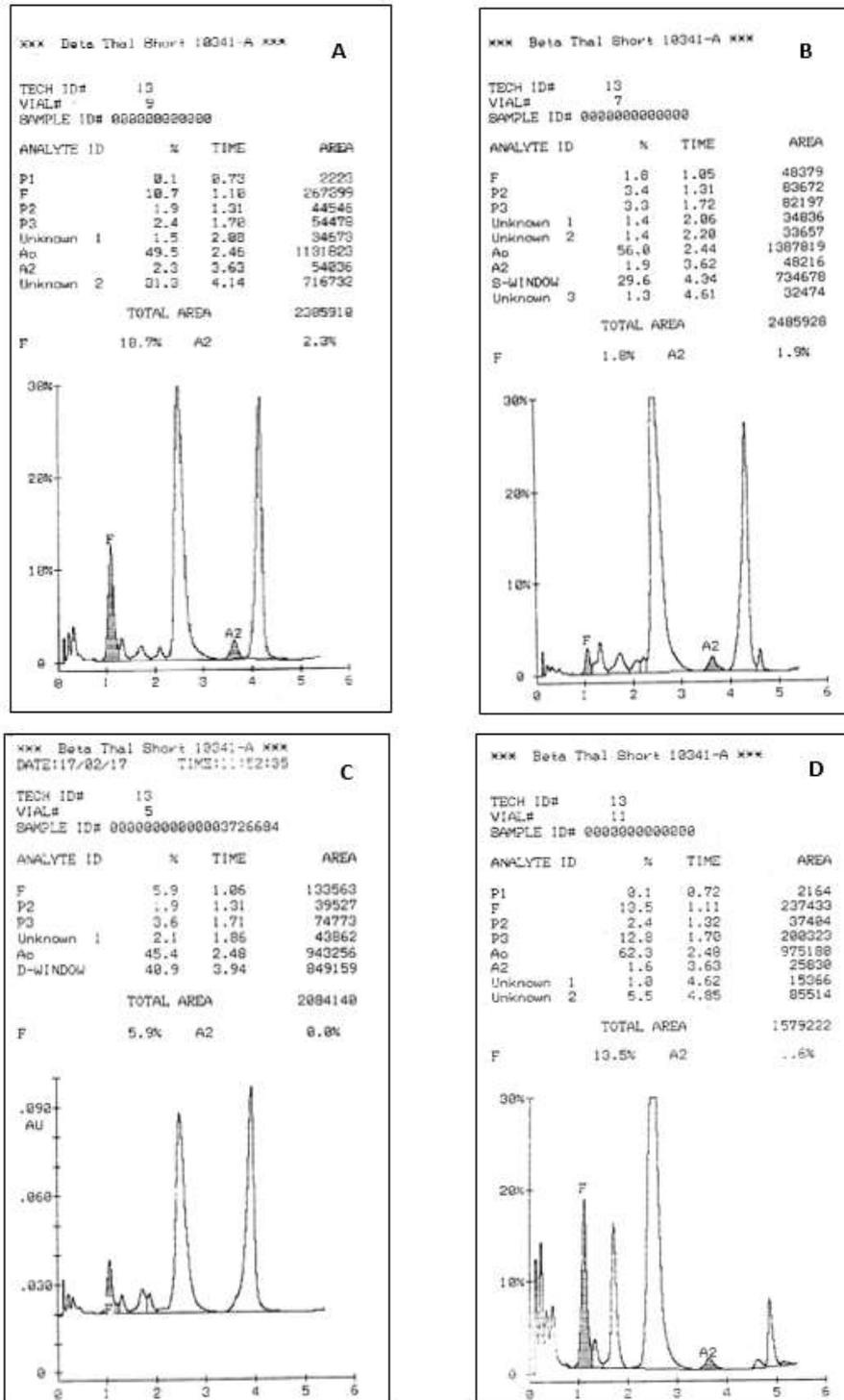
Tabela 7 – Resultado dos perfis das hemoglobinas normais e variantes com seus TR.

Amostra (Nº)	Hb F (TR)	Hb A (TR)	Hb A ₂ (TR)	Hb Var. (TR)	Hb (Sugestiva)	TR Var. (Teórico)
1	1.09	2.42	3.82	↑A ₂	E / G (?)	-
2	1.11	2.48	3.63	4.85	Constant Spring	4.9
3	1.12	2.52	3.62	4.34	Stanleyville II	4.4
4	1.12	2.49	3.65	4.17	D-Punjab	4.2
5	1.10	2.53	3.63	4.34	Stanleyville II	4.4
6	1.06	2.50	-	3.98	Korle-Bu	3.9
7	1.15	2.46	-	3.97	Korle-Bu	3.9
8	1.08	2.39	-	3.95	Korle-Bu	3.9
9	1.15	2.46	3.60	4.14	D-Punjab	4.2
10	1.06	2.18	3.56	3.98/4.42	?	-
11	1.06	2.48	-	3.94	Korle-Bu	3.9
12	1.08	2.45	3.63	4.14	D-Punjab	4.2
13	1.05	2.44	3.62	4.34	Stanleyville II	4.4
14	1.10	2.46	3.63	4.14	D-Punjab	4.2
15	1.12	2.46	-	3.92	Korle-Bu	3.9
16	1.10	2.46	3.62	4.14	D-Punjab	4.2
17	1.11	2.46	3.61	4.32	Stanleyville II	4.4

Legenda: TR –tempo de retenção em minutos; Var. – variantes.

Fonte: O Autor, 2017

Figura 9 – Perfis dos Cromatogramas característicos das Hb encontradas (continua)

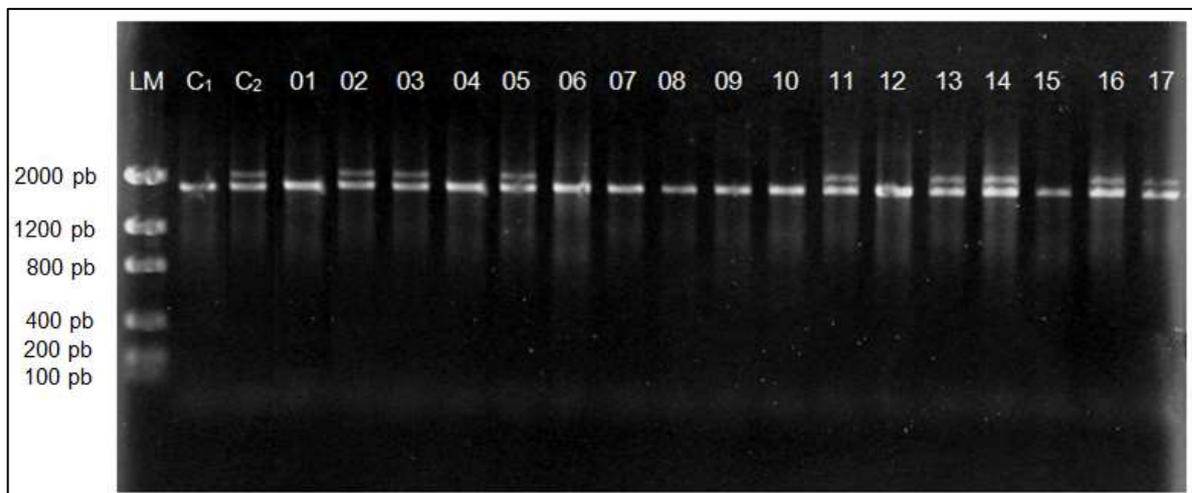


Legenda: (A) Hb D-Punjab / D - Los Angeles; (B) Hb Stanleyville II; (C) Hb Korle-Bu; (D) Hb Constant Spring.

Fonte: O Autor, 2017

O diagnóstico molecular da talassemia alfa realizado pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR- multiplex) para investigar as deleções - $\alpha^{3.7}$, - $\alpha^{4.2}$, - $\alpha^{20.5}$, - α^{SEA} e - α^{MED} , demonstrou que dentre as dezessete amostras dos recém-nascidos, oito delas (47,05%) apresentavam a deleção - $\alpha^{3.7}$ (- $\alpha^{3.7}$ / $\alpha\alpha$) em heterozigose e nas outras nove (52,95%) não foram verificadas nenhum tipo de deleção alfa talassêmica ($\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$) (Figura 10).

Figura 10 - Produtos da PCR Multiplex para deleções alfa talassêmicas.

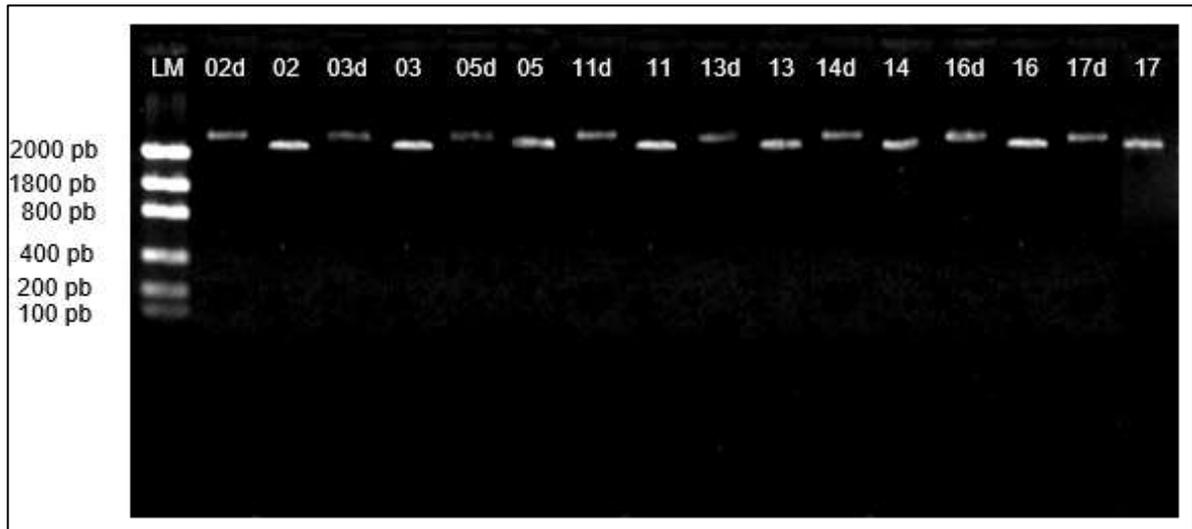


Legenda: LM - *Low DNA Mass™ Ladder*; C₁ – controle negativo gene α sem deleção ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$); C₂ – controle positivo heterozigoto com deleção - $\alpha^{3.7}$ (- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$); as colunas 07, 08, 09, 10, 12 e 15 correspondem as amostras sem deleção α - talassêmica e produtos com 1800 pb; as colunas 02, 03, 05, 11, 13, 14, 16 e 17 correspondem as amostras com deleção talassêmica no gene α em heterozigose com produtos em 2022 pb e 1800 pb do gene α não deletado.

Fonte: O Autor, 2017

A etapa de purificação dos produtos pós-PCR das amostras que correspondiam aos pacientes heterozigotos para a deleção alfa talassêmica do tipo - $\alpha^{3.7}$ foi realizada a partir do corte do gel de agarose 1%. Desta forma como as bandas a serem excisadas eram bem próximas (1800 pb e 2022 pb), uma nova eletroforese foi executada após a purificação, a fim de assegurar que não houve perda ou contaminação dos fragmentos amplificados de interesse para a continuidade do estudo (Figura 11).

Figura 11 – Produtos purificados pós-PCR a partir da fatia do gel de agarose.

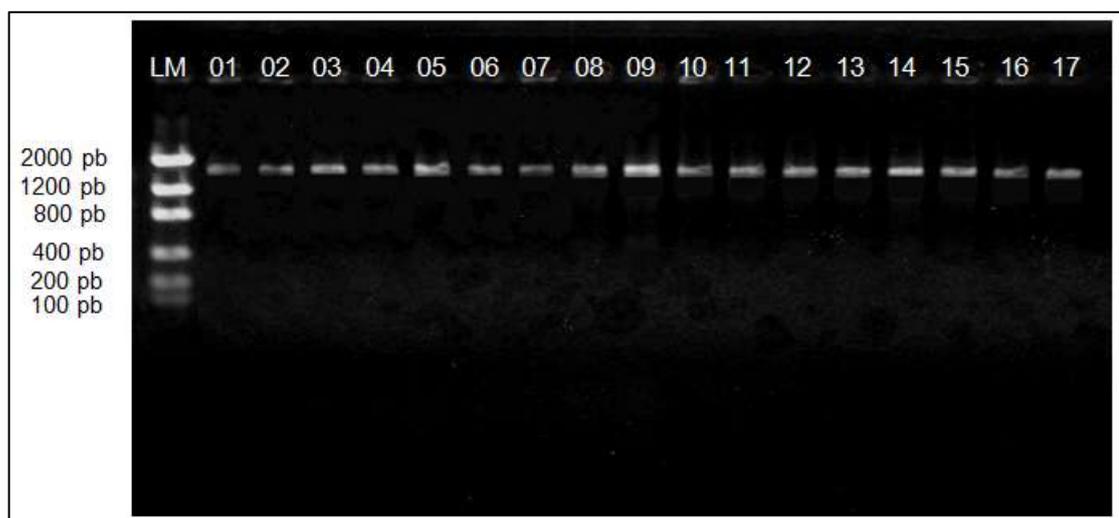


Legenda: LM - *Low DNA Mass™ Ladder*; as colunas 03d, 04d, 06d, 12d, 14d, 15d, 17d, 18d com produtos em 2022 pb, correspondem aos genes alfa que apresentam a deleção $-\alpha^{3.7}$; as colunas 03, 04, 06, 12, 14, 15, 17, 18 correspondem aos genes α que não possuem a deleção com produtos de 1800 pb.

Fonte: O Autor, 2017

A amplificação do gene da beta globina pela metodologia da PCR produziu fragmentos com tamanho esperado de 1.683 pb (Figura 12).

Figura 12 – Amplificação do gene da Beta globina pela PCR



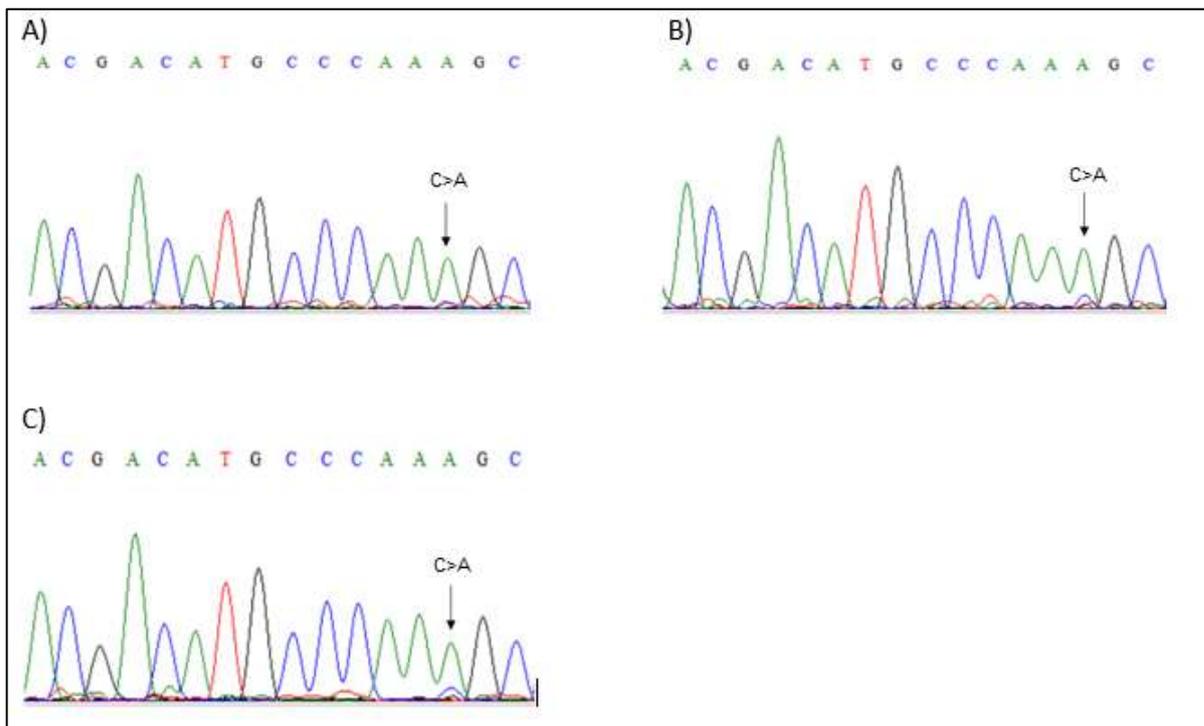
Legenda: LM - *Low DNA Mass™ Ladder*; Colunas de 01 a 17 correspondem aos produtos das amostras pós-PCR com fragmentos de 1600 pb.

Fonte: O Autor, 2017

Após a reação de sequenciamento dos produtos amplificados e purificados dos genes alfa e beta globina, foi realizada a eletroforese capilar e as sequências nucleotídicas obtidas nesta etapa foram analisadas nos programas *Bio Edit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999) e *SeqScape v 2.7* (*Applied Biosystems*™).

Os eletroferogramas correspondentes aos sequenciamentos das cadeias do gene *HBA* revelaram a presença da mutação AAC > AAA no códon 78 que codifica a Hb Stanleyville II em três amostras (Figura 13). A presença da mutação que codifica esta hemoglobina nos três casos localizava-se no gene híbrido da deleção alfa talassêmica.

Figura 13 – Eletroferogramas referentes ao gene híbrido $-\alpha^{3.7}$ de três crianças do estudo.



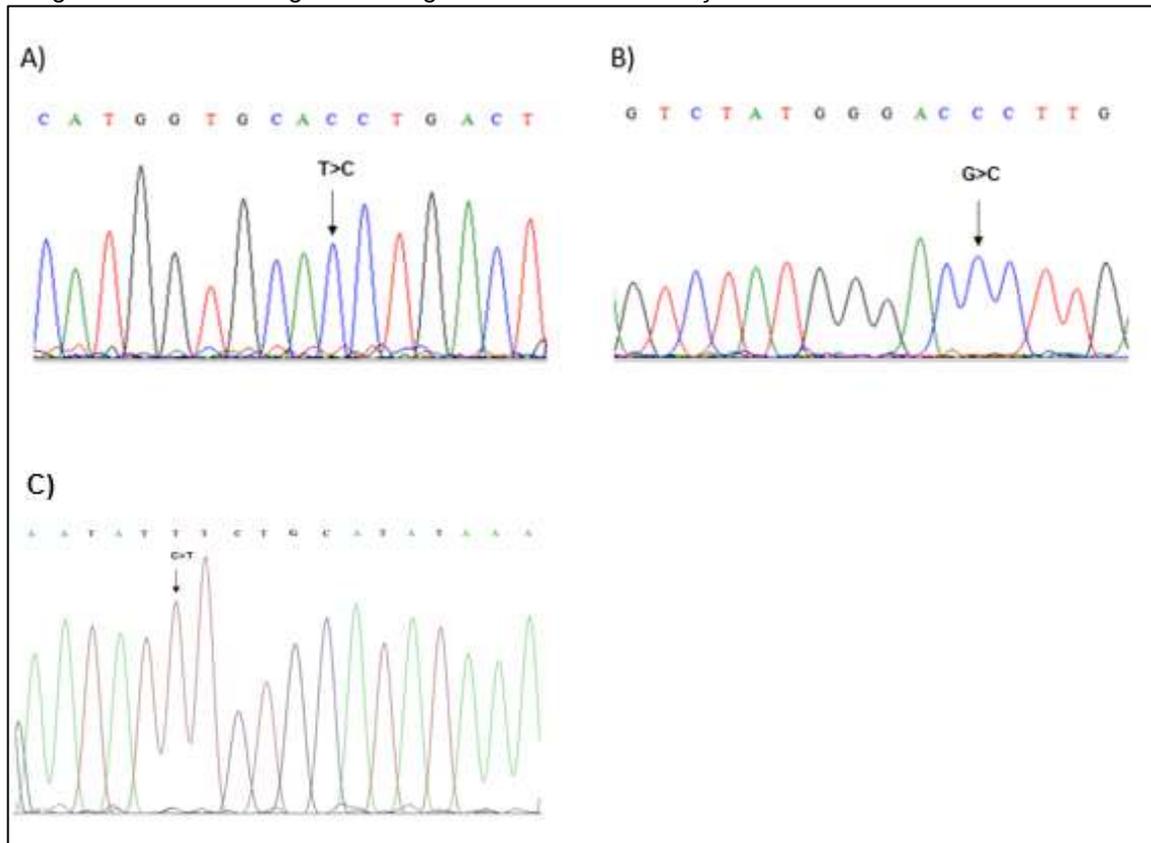
Legenda: Eletroferogramas A, B e C correspondentes aos sequenciamentos dos genes híbridos $-\alpha^{3.7}$ de três crianças do estudo evidenciando a mutação AAC>AAA, que codifica a Hb Stanleyville II.

Fonte: O Autor, 2017

Nos sequenciamentos do gene *HBB* nesses mesmos três casos, foram verificados três polimorfismos. O primeiro do tipo *indel*, ocorre no éxon 1 na posição HBB: c.9T>C, enquanto os outros dois se localizam no íntron 2 (*IVS-II-16*, G>C) e

(*IVS-II-74*, T>G), sendo um na posição *HBB*: c.315+16 G>C e o terceiro polimorfismo na posição c.316 – 185C>T (Figura 14).

Figura 14 – Eletroferogramas do gene *HBB* de três crianças do estudo.



Legenda: (A) Eletroferograma correspondente ao polimorfismo do éxon 1 (*HBB*: c.9T>C);
 (B) Eletroferograma correspondente ao polimorfismo no íntron 2 (*IVS-II-16*, G>C)
HBB: c.315+16 G>C; (C) Eletroferograma correspondente ao polimorfismo no
 íntron 2 (*IVS-II-74*, T>G), *HBB*: c.316 – 185C>T.

Fonte: O Autor, 2017

5. DISCUSSÃO

A técnica de cromatografia líquida de alta performance utilizada para triagem neonatal de hemoglobinopatias é um método confiável, reproduzível e, em muitos casos, superior à eletroforese convencional em hemoglobina para a detecção e identificação de variantes de hemoglobina. Os testes de confirmação por eletroforese podem ser eliminados na maioria dos casos, por meio do tempo de retenção, proporção de hemoglobina total e características de pico da HPLC (JOUTOVSKY; HADZI-NESIC; NARDI, 2004).

A realização de novos testes, a partir do sangue total coletado em EDTA pelo método de cromatografia líquida de alta performance no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFRJ, revelou informações complementares em relação ao inicialmente realizado no HEMORIO. Embora ambos utilizem metodologia de troca iônica, os cromatogramas gerados pelo sistema automatizado *VARIANT*[®] da BIORAD forneceu informações mais sugestivas com relação as hemoglobinas variantes. As amostras das hemoglobinas *S-like* estavam bem definidas apresentando em seus cromatogramas perfis característicos da variante correspondente. Apenas duas amostras dentre as dezessete testadas não se apresentaram desta forma, necessitando de avaliações adicionais.

A elevada incidência de hemoglobinas anormais bem como de talassemias no Brasil, faz com que as associações entre elas apareçam com maior frequência dificultando o diagnóstico. As hemoglobinas denominadas *S-like* apresentam características que envolvem substituições de aminoácidos na molécula que não produzem alterações significativas em seu comportamento funcional, uma vez que geram pequenas ou nenhuma diferença de carga elétrica. A possibilidade destas variantes se confundirem a Hb S é significativa, pois os principais métodos utilizados na triagem neonatal se baseiam na cromatografia de troca iônica (HPLC) e na diferença de carga elétrica dos aminoácidos das cadeias globínicas.

Os resultados dos testes de solubilidade com ditionito de sódio, também foram analisados no estudo, porém, os mesmos, só foram realizados nos pais das crianças e todos com resultados negativos. O teste foi verificado no progenitor onde estava presente a variante, pois como os bebês possuem a hemoglobina fetal em maior

concentração e a Hb S reduzida (caso possuía), podem produzir resultados falso-negativos.

Uma variante de cadeia alfa globina pode ser diferenciada da variante de cadeia beta pela proporção da variante. Geralmente, uma variável estável da cadeia beta constitui cerca de 40-45% da Hb total e pode ser clinicamente significativa. Uma variável de cadeia alfa estável pode constituir cerca de 20-25% da Hb total e geralmente é clinicamente insignificante (BAIN, 2006). No entanto, a diferença de expressão é menos clara quando a variante da cadeia alfa está em combinação com α -talassemia. Um estudo realizado no Reino Unido demonstrou que de 28 variantes, com diagnóstico presuntivo de Hb G-Philadelphia, apenas 24 eram na verdade essa variante. Utilizando a metodologia de digestão com enzima de restrição (*StyI*), 22 casos eram a variante C>G Hb G-Filadélfia e dois casos da variante C>A só foram confirmados por sequenciamento de DNA. Quatro outras variantes de uma cadeia com um fenótipo semelhante a Hb G-Philadelphia foram identificadas por sequenciamento de DNA dentre elas Hb G-Norfolk, Hb Stanleyville-II, Hb Matsue-Oki e Hb Mizushi. Nesse estudo foi demonstrado que não só as variáveis D-Punjab, G-Norfolk, G-Filadélfia se sobrepõem na janela D, mas também Hb Stanleyville-II, Hb Matsue-Oki e Hb Mizushi. Embora as variantes da cadeia alfa possam ser diferenciadas de variantes da cadeia beta no HPLC pelo percentual da variante em muitos casos, os fenótipos dessas variantes da cadeia alfa são muito similares e, portanto, o tempo de retenção de HPLC e as posições na focalização isolelétrica não são confiáveis indicadores de diagnóstico como mostrado em variantes de cadeia beta (KHALIL *et al.*, 2009; KHALIL *et al.*, 2011).

A deleção alfa talassêmica nos indivíduos do grupo estudado foi verificada em 47,05% das amostras, sendo que em todos a deleção presente era do tipo $-\alpha^{3.7}$, na forma heterozigota. No Brasil, a deleção $-\alpha^{3.7}$ é a mutação mais frequentemente encontrada, devido à grande miscigenação da população com importante contribuição genética africana (BORGES *et al.*, 2001; SONATI *et al.*, 1991; WAGNER *et al.*, 2010). O Censo Demográfico realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2010, revelou que o estado do Rio de Janeiro é o segundo estado com maior proporção de pessoas com cor ou raça negra (12,4% da população, cerca de 2 milhões de pessoas), só perdendo para a Bahia, onde 17,1% (2,4 milhões de pessoas) se declararam da raça negra fato que pode justificar a prevalência elevada desta mutação deletional. (disponível em:

https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/93/cd_2010_caracteristicas_populacao_domicilios.pdf).

Adorno e colaboradores (2005) analisou, em uma população bem maior que a do presente estudo, a prevalência de α -talassemia através da análise de cordão umbilical de 590 recém nascidos e constatou a presença da deleção alfa talassêmica em 22.2% das amostras, todas do tipo $-\alpha^{3.7}$.

Foi avaliada também a prevalência de α^+ -talassemia relacionada às deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ em 92 crianças e adolescentes de 0 a 14 anos com microcitose, atendidas em um hospital universitário pediátrico do Rio de Janeiro, o Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG/UFRJ) e o foi observada a α^+ -talassemia em 55,4% dos indivíduos (SIQUEIRA, 2015).

A associação da talassemia alfa do tipo $-\alpha^{3.7}$ foi encontrada nos três casos de Hb Stanleyville II confirmadas pelo sequenciamento de DNA do estudo. O quarto caso de Hb Stanleyville II, não sequenciado, também está associado a deleção tipo $-\alpha^{3.7}$. As Hb D-Punjab, Hb Korle-Bu e Hb Constant Spring sugestivas pela cromatografia líquida de alta performance, aparecem em associação a deleção alfa talassêmica $-\alpha^{3.7}$.

A Hb D-Punjab ou D-Los Angeles presente em cinco crianças (29,4%) das dezessete triadas, originou-se na Índia, mas devido a dispersão para outras regiões do mundo pelos novos movimentos migratórios, atualmente apresenta ampla distribuição mundial. Vários autores já descreveram esta variante, relativamente comum no Brasil e associada a talassemia alfa (CHINELATO-FERNANDES; BONINI-DOMINGOS, 2005; SILVA *et al.*, 2012; SONATI *et al.*, 1996; TORRES *et al.*, 2015).

A Hb Korle-Bu é encontrada principalmente em famílias provenientes de Gana e Costa do Marfim, países africanos que contribuíram para a formação da população brasileira através do tráfico de escravos. Entretanto, os dados históricos sobre o tráfico indicam que os indivíduos dessa região foram levados preferencialmente para a região da Bahia. As amostras do estudo foram provenientes de indivíduos das regiões sudeste, sul e centro-oeste (SP, RJ, MG, ES, RS, SC, MS e MT). Isso pode ser explicado pelo intenso fluxo migratório interno de indivíduos nordestinos para outros estados, em busca de novas oportunidades de emprego (CHINELATO-FERNANDES; BONINI-DOMINGOS, 2005), foi verificada também em 29,4% dos casos estudados.

Uma única amostra de sangue, dentre as dezessete presentes no estudo, foi sugestiva pelo HPLC para Hb Constant Spring (Hb CS) em associação com a

talassemia alfa do tipo $\alpha^{3.7}$. Os dois relatos que seguem a Hb CS não apresentam esta associação. O primeiro caso aparece descrito na mãe de uma gestante que apresentava heterozigose composta para Hb E [b26 (B8) Glu→Lys, GAG>AAG] e outra variante de cadeia beta. A análise de DNA demonstrou que ela carregou a mutação de Hb Korle-Bu [B73 (E17) Asp→Asn (GAT>AAT)] para a Hb E e uma talassemia alfa-1 (α -thal-1) com deleção do Sudeste Asiático ($-\text{SEA}$). Estudo de seus familiares revelaram que seu pai e sua irmã eram duplos heterozigotos para Hb Korle-Bu e α -thal-1, enquanto que sua mãe era um duplo heterozigoto para Hb E / Hb Constant Spring [Hb CS; A142, Term→Gln (TAA>CAA $\alpha 2$)] (SIRIRATMANAWONG *et al.*, 2009). O segundo relato é de uma paciente do ambulatório de ginecologia e obstetrícia na China, com 37 anos de idade apresentando um quadro de anemia, com hemoglobina de 6,6 g / dL, MCV 58,0 fl e MCH 16,6 pg, sem esplenomegalia. O sangue foi analisado por cromatografia líquida automatizada de alto desempenho e a percentagem da variante Hb foi de 27,53%, Hb A2 0,67%, Hb CS 0,8% e Hb A 71,0%. Os genes α -talassemia 1 (tipo SEA) e α -talassemia 2 ($-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$) foram amplificados pela técnica da Polimerase de reação em cadeia (GAP-PCR) e os resultados para α -talassemia foram normais. Os dois genes de α -globina ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) foram amplificados por PCR e o sequenciamento genético foi realizado. O sequenciamento do gene $\alpha 1$ -globina revelou uma substituição de AAC → AAA no códon 78 (asparagina para a lisina), indicando a presença de Hb Stanleyville II e uma substituição de TAA → CAA no códon 142 foi encontrada no gene $\alpha 2$ -globina, que constatou o diagnóstico de Hb CS (LIN *et al.*, 2011).

Com relação ao estudo do gene *HBA1* não foi possível o sequenciamento. O iniciador S1 embora tenha sido testado na ferramenta *primer-blast*, não foi eficiente para a amplificação do gene *HBA1* (disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>>). Um fato pelo qual essa amplificação possa não ter ocorrido na prática, é que o gene *HBA2* expressa de duas a três vezes mais que o gene *HBA1*, embora *HBA1* e *HBA2* sejam homólogos e codificam a mesma proteína (HIGGS *et al.*, 1989).

No estudo de hemoglobinas S-like no PNTN-MG é relatado a dificuldade do sequenciamento dos genes da alfa globina pela presença de um alelo híbrido denominado $\alpha 212$, até então não conhecido na população brasileira e com poucos relatos internacionais. Esse gene parece ter sido resultado de um crossover desigual entre um cromossomo selvagem contendo os genes *HBA2* e *HBA1* e um cromossomo

contendo o gene híbrido $-\alpha^{3.7}$. Segundo a pesquisadora pode ser que haja outros casos do gene híbrido α^{212} devido ao grande número de casos talassemia alfa do tipo $-\alpha^{3.7}$ encontrados na população brasileira (SILVA, 2012) e verificados no presente trabalho.

A amplificação seletiva de genes, a purificação e a sequência direta de DNA de cada gene de α -globina são tecnicamente desafiadoras, uma vez que os genes $\alpha 1$ -globina e $\alpha 2$ -globina são quase indistinguíveis, resultantes de uma duplicação de gene primitivo (UAPRASERT *et al.*, 2017). O *cluster* dos genes da alfa globina humana localizado no cromossomo 16 abrange cerca de 43 kb (HUA-BING; DE-PEI; CHIH-CHUAN, 2002) e uma vez que os genes $\alpha 1$ -globina e $\alpha 2$ -globina são quase indistinguíveis, os dois genes da α -globina compreendem três exóons idênticos, assim como o primeiro íntron. Os seus segundos íntrons são semelhantes, exceto três bases diferentes e nove bases no gene $\alpha 1$ -globina. As sequências dos dois genes de α -globina divergem umas das outras na região 3' não traduzida (UTR's) (UAPRASERT *et al.*, 2017).

Outro fator complicador para a amplificação seletiva dos genes da alfa globina é a concentração de GC (60-80%), que pode gerar uma estabilidade térmica e a formação de uma estrutura secundária interferindo na reação de PCR. Muitos trabalhos realizados por pesquisadores descritos nesse estudo, utilizam técnicas de polimorfismo com fragmento de restrição para hemoglobinas conhecidas, porém essas técnicas não são capazes de identificar mutações desconhecidas

A mutação que resulta Hb Stanleyville-II está localizada na terceira base do códon 78 (AAC>AAG) nos genes da $\alpha 1$ ou $\alpha 2$ -globina (disponível em: <http://globin.cse.psu.edu/>). No estudo dos genes HBA2 e do gene híbrido $-\alpha^{3.7}$, no entanto, foi observado que a mutação ocorreu no gene híbrido, em três amostras dos quatro casos de Hb Stanleyville II, com a substituição de C>A (AAC> AAA), diferente da maioria dos autores que descrevem a mudança da base C>G no sequenciamentos realizados. (BURCHALL; MAXWELL, 2010; DRAUBE *et al.*, 2007; GONZÁLEZ FERNANDO *et al.*, 2008; WAITUMBI *et al.*, 2007; WENNING *et al.*, 2000).

A localização da mutação no gene híbrido $-\alpha^{3.7}$ que resulta Hb Stanleyville II descrita no presente trabalho parece ser incomum, pois apenas dois estudos descrevem este relato. Um deles realizado por meio de HPLC, IEF e sequenciamento de DNA encontraram dois casos de Stanleyville-II em heterozigose no gene alfa2 (237C>A) e 3 casos no gene híbrido alfa talassêmico (237C>G) (Moradkhani, 2009).

O segundo descreve dois casos de bebês do PNTN-MG alfa talassêmicos em homozigose do tipo $-\alpha^{3.7}$ com a Hb Stanleyville II presente no gene híbrido (Pimentel, 2011).

Os sequenciamentos dos genes *HBB* correspondentes aos das amostras onde foram verificadas as mutações nos genes híbridos $-\alpha^{3.7}$, revelaram três polimorfismos que se repetiram nos três casos.

O primeiro deles está localizado no éxon 1 no códon 9 (CAT>CAC) com substituição na terceira base de T>C (*HBB*: c.9T>C). O segundo polimorfismo está localizado no intron 2 (*IVS-II-16*, G>C) com substituição da base G >C (*HBB*: c.315+16 G>C) e por fim o terceiro, também localizado no segundo íntron (*IVS-II- 666*, C>T) com a substituição de C>T (*HBB*: c.316-185 C>T). A significância clínica destes polimorfismos é benigna, podendo o primeiro surgir pela condição clínica de traços quantitativos de Hb F (disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/193106/>).

Uma pesquisa realizada para determinar a frequência mutacional do gene *HBB* em uma população no leste da Índia revelou onze novas mutações dentre elas as três descritas nesse trabalho. Além disso, a mais comum entre elas era a (*HBB*: c.9T>C) com a frequência de 19,57% e dentre as presentes nos íntrons as mais frequentes eram a *IVS-II-16*, G>C (11.96%) e *IVS-II- 666*, C>T (13,04%). Estas mutações foram relatadas como sem efeito, ou efeito muito leve, na expressão da beta globina (SAHOO; BISWAL; DIXIT, 2014).

Outro relato do polimorfismo verificado em nosso estudo, foi descrito em um trabalho com amostras do estado do Rio de Janeiro para avaliar o perfil mutacional da beta talassemia. Dentre as mutações encontradas estão os polimorfismos da *HBB*: c.315+16 G>C e *IVS-II-74* (T>G), no segundo íntron relatados como mudanças moleculares comuns em pacientes com talassemia, bem como o site polimórfico XmnI -158 (C> T) em um estado heterozigótico, conhecido por influenciar níveis de Hb F (CARROCINI *et al.*, 2017).

Como perspectivas futuras, para a amplificação seletiva do gene *HBA1* está sendo estudada a realização de uma *nested*-PCR a fim de melhorar a especificidade e a eficiência da reação.

A identificação das hemoglobinas triadas no PNTN-RJ para esse trabalho e que não foram concluídas pela metodologia de sequenciamento genético, as mesmas

serão realizadas e os resultados serão disponibilizados ao Instituto de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (HEMORIO).

Concluindo, o presente estudo reafirma que os métodos diagnósticos utilizados nos programas de triagem neonatal para hemoglobinopatias são confiáveis e possuem reprodutibilidade, porém suas limitações são evidentes principalmente para identificação de hemoglobinas variantes com mutações desconhecidas. A associação entre hemoglobinas variantes *S-like* e a talassemia alfa se mostra evidente (47,05%), embora o estudo tenha sido realizado com um número reduzido de indivíduos. Os achados numéricos aqui encontrados não se distanciam de percentuais registrados em pesquisas com grandes amostras populacionais, como descrito anteriormente.

Aqui não existe a pretensão de tornar a metodologia de sequenciamento genético o método de diagnóstico para hemoglobinopatias nos PETN, porém sua utilização se faz necessária nos casos não resolvidos pelos métodos utilizados e de maior complexidade diagnóstica. Além disso, os conhecimentos agregados pelo estudo genéticos servirão para novas estratégias metodológicas. Para que os programas de triagem populacionais sejam eficazes é necessário que se conheça o espectro mutacional de genes da população normal.

Um novo desafio se torna claro na investigação das hemoglobinopatias com os novos fluxos migratórios em todo mundo. No Brasil, esse movimento vem aumentando sensivelmente e segundo dados do Conare (Comitê Nacional para os Refugiados), do Ministério da Justiça, o número reconhecido de refugiados em 2016 aumentou 12%, chegando a 9552 pessoas de 82 nacionalidades diferentes. O país com maior número de refugiados é a Síria, seguido da República Democrática do Congo, Paquistão, Palestina e Angola. Os países com maior número de solicitações de refúgio em 2016, no Brasil, foram a Venezuela, com aumento expressivo em relação a 2015 (307%), Cuba, Angola, Haiti e Síria (disponível em: www.agenciabrasil.ebc.com.br). A formação da identidade genética do Brasil, iniciada no ano de 1500, com a chegada dos colonizadores portugueses, parece ter um novo capítulo, porém agora com novos personagens e nova bagagem genética.

CONCLUSÕES

A presença de Hb *S-like* pode levar ao falso diagnóstico de doença falciforme ou traço.

As hemoglobinas Stanleyville II, D-Punjab (D-Los Angeles) e Korle-Bu, ocorreram com frequência no estudo realizado e, embora não sejam frequentes, não são incomuns.

É comum a associação entre talassemia alfa do tipo $-\alpha^{3.7}$ e as hemoglobinas variantes *S-like* nas amostras analisadas.

O estudo dos genes *HBA* pela metodologia de sequenciamento genético identificou uma mutação, no gene híbrido da deleção alfa talassêmica, em três amostras.

A presença da Hb Stanleyville II com a mutação na terceira base do correspondente ao códon 78 (AAC>AAA) no gene híbrido $-\alpha^{3.7}$ é incomum e esse parece ser o segundo caso descrito no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ADORNO, E.V. *et al.* Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cadernos de saúde pública*, v. 21, n. 1, p. 292–298, 2005.
- AMATO, A. *et al.* Interpreting elevated fetal hemoglobin in pathology and health at the basic laboratory level: New and known γ -gene mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *International Journal of Laboratory Hematology*, v. 36, n. 1, p. 13–19, 2014.
- BAIN, B.J. *Hemoglobinopathy Diagnosis*. 2^a ed. Oxford, Reino Unido: [s.n.], 2006.
- BIO-RAD LABORATORIES. *Variant beta-thalassemia short program instruction manual*. . California, EUA: [s.n.] , 2006
- BONINI-DOMINGOS, C.R. *Prevenção das hemoglobinopatias no Brasil – Diversidade Genética e Metodologia Laboratorial*. 1993. 144f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 1993 , 1993.
- BORGES, E. *et al.* High prevalence of α -thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 34, n. 6, p. 759–762, 2001.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria GM/MS no 822/GM em 6 de junho de 2001. Instituição do Programa de Triagem Neonatal, no âmbito do Sistema Único de Saúde, para fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, fibrose cística e hemoglobinopatias - Brasília, MS/Jun, 2001. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2001/GM/GM-822.htm>> . Acesso em 05 jan. 2015.
- BRASIL, Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. (Censo Demográfico 2010. Características da população e dos domicílios. Resultados do Universo), Instituto de Geografia e Estatística - IBGE, Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/caracteristicas_da_populacao>. Acesso em 12 abr. 2017.
- BURCHALL, G.; MAXWELL, E. Haemoglobin Stanleyville II modifies sickle disease phenotype. *Pathology*, v. 42, n. 3, p. 310–312, 2010.
- CANÇADO, R.D. Talassemias alfa. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, v. 28, n. 2, p. 86–87, 2006.
- CANÇADO, R.D.; JESUS, J.A. A Doença Falciforme no Brasil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 29, n. 3, p. 204–206, 2007.
- CARROCINI, G.C.S. *et al.* Mutational Profile of Homozygous β -Thalassemia in Rio de Janeiro, Brazil. *Hemoglobin*, v. 41, n. 1, p. 12–15, 2017.

CHINCHANG, W. *et al.* Molecular analysis of unknown β -globin gene mutations using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) technique and its application in Thai families with β -thalassemias and β -globin variants. *Clinical Biochemistry*, v. 38, p. 987–996, 2005.

CHINELATO-FERNANDES, A.R.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Contribuição do estudo molecular de hemoglobinas S-like para o conhecimento da diversidade genética da população brasileira. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, v. 27, n. 3, p. 208–212, 2005.

CHONG, S.S. *et al.* Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of α -thalassemia. *Blood*, v. 95, n. 1, p. 360–362, 2000.

CHUI, D.H.K.; FUCHAROEN, S.; CHAN, V. Hemoglobin H disease: Not necessarily a benign disorder. *Blood*, v. 101, n. 3, p. 791–800, 2003.

COSTA, F.F. *et al.* The association of Hb Stanleyville II with alpha thalassemia and Hb S. *Nouvelle revue française d'hématologie*, v. 29, n. 6, p. 387–390, 1987.

COSTA, F.F.; SONATI, M.F.; ZAGO, M.A. Hemoglobin Stanleyville II (alpha 78 Asn→Lys) is associated with a 3.7-kb alpha-globin gene deletion. *Human Genetics*, v. 86, n. 3, p. 319–320, 1991.

DE GALIZA NETO, G.C.; DA SILVA PITOMBEIRA, M. Aspectos moleculares da anemia falciforme Molecular aspects for sickle cell anemia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 1, p. 51–56, 2003.

DHERTE, P. *et al.* Stanleyville I And II: Two New Variants Of Adult Haemoglobin. *The British Medical Journal*, v. 2, n. 5147, p. 282–284, 1959.

DRAUBE, A. *et al.* Cytomorphologic signs of severe pernicious anemia obscured in a patient with heterozygous hemoglobin Stanleyville II. *European Journal of Haematology*, v. 79, n. 4, p. 360–362, 2007.

FLEURY, M.K. Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: Aspectos clínicos e laboratoriais. *Revista brasileira de análises clínicas*, v. 39, n. 2, p. 89–93, 2007.

FUCHAROEN, S. *et al.* MOLECULAR CHARACTERIZATION OF Hb D-PUNJAB [b121(GH4)Glu→Gln] IN THAILAND. *HEMOGLOBIN*, v. 26, n. 3, p. 261–269, 2002.

FUCHAROEN, S. *et al.* Rapid molecular characterization of Hb Queens and Hb Siam: Two variants easily misidentified as sickle Hb. *Clinical Biochemistry*, v. 40, p. 137–140, 2007.

GÓMEZ-CHIARI, M.; TUSELL PUIGBERT, J.; ORTEGA ARAMBURU, J. Drepanocitosis: experiencia de un centro Palabras clave: SICKLE CELL ANEMIA: EXPERIENCE IN A CENTER Background. *An Pediatr*, v. 58, n. 2, p. 95–99, 2003.

GONZÁLEZ FERNANDO, A. *et al.* Hemoglobina Stanleyville II [78(EF7)Asn→Lys]. Primer caso descrito en España. *Medicina clínica (Barcelona)*, v. 131, n. 12, p. 463–465, 2008.

GROSVELD, F.; DILLON, N.; HIGGS D. The regulation of human globin gene expression. *Bailliere's Clinical Haematology*, v. 6, n. 1, p. 31–55, 1993.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, p. 95–98, 1999.

HARTEVELD, C.L.; HIGGS, D.R. Alpha-thalassaemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 5, n. 13, p. 7–21, 2010.

HASSAN, W. *et al.* Functional studies of the double mutant hemoglobin Stanleyville II/S α 278 Lys β 26 Val: Identification of a site of intermolecular contact on the α chain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 77, n. 3, p. 1108–1117, ago. 1977.

HERRICK, J.B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 74, p. 179–184, 2001.

HIGGS, D.R. *et al.* A Review of the Molecular Genetics of the Human α -Globin Gene Cluster. *Blood*, v. 73, n. 5, p. 1081–1104, 1989.

HUA-BING, Z.; DE-PEI, L.; CHIH-CHUAN, L. The control of expression of the α -globin gene cluster. *International journal of hematology*, v. 76, n. 5, p. 420–426, 2002.

ITANO, H.A. A Third abnormal hemoglobin associated with hereditary hemolytic anemia. *Proceedings of the national academy of sciences*, v.37, n. 12, p. 775-784, 1951.

JOMOUI, W. *et al.* Hemoglobin constant spring among southeast asian populations: Haplotypic heterogeneities and phylogenetic analysis. *PLoS ONE*, v. 10, n. 12, p. 1–9, 2015.

JORGE, S.E. *et al.* Hb S-São Paulo: A new sickling hemoglobin with stable polymers and decreased oxygen affinity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 519, p. 23–31, 2012.

JORGE, S.E. *et al.* Three New α -Globin Variants: Hb Itapira [α 30(B11)Glu→Val (α 1)], Hb Bom Jesus Da Lapa [α 30(B11)Glu→Ala (α 1)] and Hb Boa Esperança [α 16(A14)Lys→Thr (α 2)]. *Hemoglobin*, v. 31, n. 2, p. 151–157, 2007.

JOUTOVSKY, A.; HADZI-NESIC, J.; NARDI, M.A. HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies: A study of 60 000 samples in a clinical diagnostic laboratory. *Clinical Chemistry*, v. 50, n. 10, p. 1736–1747, 2004.

KHALIL, M. *et al.* The accurate prediction of rare hemoglobin variants using a combination of high performance liquid chromatography, retention time and isoelectric focusing electrophoresis position. *Saudi medical journal*, v. 30, n. 9, p. 1158–1164, 2009.

KHALIL, M.S.M. *et al.* Haemoglobin (Hb) G-Philadelphia, Hb Stanleyville-II, Hb G-Norfolk, Hb Matsue-Oki and Hb Mizushi can form a panel of alpha-chain variants that overlap in their phenotype: The novel use of Styl to screen for Hb G-Philadelphia. *International Journal of Laboratory Hematology*, v. 33, p. 318–325, 2011.

LIN, M. *et al.* Hb Stanleyville II [alpha 78(EF7)Asn→Lys] occurrence in combination with Hb Constant Spring. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, v. 46, n. 2, p. 145–146, 2011.

LOBO, C.L.C. *et al.* Newborn Screening Program for Hemoglobinopathies in Rio de Janeiro, Brazil. *Pediatric Blood Cancer*, v. 61, p. 34–39, 2014.

MANCA, L.; MASALA, B. Disorders of the synthesis of human fetal hemoglobin. *IUBMB Life*, v. 60, n. 2, p. 94–111, 2008.

MARTYN, G.E.; QUINLAN, K.G.R.; CROSSLEY, M. The regulation of human globin promoters by CCAAT box elements and the recruitment of NF-Y. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, v. 1860, n. 5, p. 525–536, 2017.

NAOUM, P.C.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Doença falciforme no Brasil. Origem, genótipos, haplótipos e distribuição geográfica. *Jornal brasileiro de patologia*, v. 33, n. 3, p. 145–153, 1997.

NUZZO, D.V.P.; FONSECA, S.F. Anemia falciforme e infecções. *Jornal de pediatria*, v. 80, n. 5, p. 347–354, 2004.

OBEROI, S. *et al.* HbSD-Punjab: Clinical and Hematological Profile of a Rare Hemoglobinopathy. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, v. 36, p. 140–144, 2014.

ORLANDO, G.M. *et al.* Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. *Revista brasileira hematologia hemoterapia*, v. 22, n. 2, p. 111–121, 2000.

OSTENDORF, N. *et al.* Hemoglobin (Hb) Stanleyville II Causes Gross Overestimation of the Hb A1c Proportion in Routine HPLC. *The American Association for Clinical Chemistry*, v. 51, n. 9, p. 1752–1754, 2005.

PALIS, J. Ontogeny of erythropoiesis. *Current opinion in hematology*, v. 15, n. 3, p. 10, 2008.

PIMENTEL, F.S. *et al.* Homozygous Hb Stanleyville-II [alpha2 78(EF7) Asn→Lys; HBA2:c.237C>A, not C>G] associated with genotype -alpha 3.7/-alpha 3.7 in two Brazilian families. *International Journal of Laboratory Hematology*, v. 33, p. 566–569, 2011.

RAMALHO, A.S.; MAGNA, L.A.; PAIVA E SILVA, R.B. A Portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. *Caderno Saúde Pública, Rio de Janeiro*, v. 19, n. 4, p. 1195–1199, 2003.

REZENDE, P.V. *et al.* Clinical, hematological and genetic data of a cohort of children with hemoglobin SD. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 2016.

ROPERO, P.; VILLEGAS, A.; GONZÁLEZ, F.A. Hemoglobin Korle-Bu [beta73(E17)Asp→Asn]. First cases described in Spain. *Medicina Clínica*, v. 123, n. 7, p. 260–261, 2004.

SAHOO, S.S.; BISWAL, S.; DIXIT, M. Distinctive Mutation Spectrum of the HBB Gene in an Urban Eastern Indian Population. *Hemoglobin*, v. 38, n. 1, p. 33–38, 2014.

SILVA, M.R. *Estudo de hemoglobinas variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da hemoglobina S em crianças do programa de triagem neonatal de Minas Gerais (PTN-MG)*. 2012. 115f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2012.

SILVA, M.R. *et al.* Hb Stanleyville-II [α 78(EF7)Asn→Lys (α 2); HbA2: c.237C>A]: incidence of 1:11,500 in a newborn screening program in Brazil. *Hemoglobin*, v. 36, n. 4, p. 388–394, 2012.

SILVA FILHO, I.L. *Características clínicas, moleculares e laboratoriais de crianças com doença falciforme do Rio de Janeiro*. 2010. 203f. Tese (Doutorado) Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.

SIQUEIRA, P.F.R. Nova ferramenta de suporte para o rastreamento de α -talassemia em pacientes com microcitose. 2015. 150f. Dissertação (Mestrado em Ciências), 2015.

SIRIRATMANAWONG, N. *et al.* Complex interaction of Hb E [beta26(B8)Glu→Lys], Hb Korle-Bu [beta73(E17)Asp→Asn] and a deletional alpha-thalassemia-1 in pregnancy. *Hemoglobin*, v. 33, n. 6, p. 514–517, 2009.

SONATI, M.F. *et al.* Hereditary hemoglobinopathies in a population from southeast Brazil. *Hemoglobin*, v. 20, n. 2, p. 175–179, 1996.

SONATI, M.F. *et al.* High Prevalence of α -Thalassemia in a Black Population of Brazil. *Hemoglobin*, v. 15, n. 4, p. 309–311, 1991.

SOUZA, A.E.S. *et al.* α -Thalassemia (3.7 kb deletion) in a population from the Brazilian Amazon region: Santarém, Pará State. *Genetics and Molecular Research*, v. 8, n. 2, p. 477–481, 2009.

STUART, M.J.; NAGEL, R.L. Sickle-cell disease. *The Lancet*, v. 364, p. 1343–1360, 2004.

TOMÉ-ALVES, R. *et al.* Hemoglobinas AS/ alfa Talassemia -importância diagnóstica. *Revista brasileira de hematologia hemoterapia*, v. 22, n. 3, p. 388–394, 2000.

TORRES, L.S. *et al.* Hemoglobin D-Punjab: origin, distribution and laboratory diagnosis. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 37, n. 72, p. 120–126, 2015.

UAPRASERT, N. *et al.* The first validated criteria for effective screening and a new simplified method for α -globin gene sequencing for diagnosis of uncommon α -globin mutations. *International Journal of Hematology*, v. 105, p. 819–827, 2017.

WAGNER, S.C. *et al.* Neonatal Screening for Hemoglobinopathies: Results of a Public Health System in South Brazil. *GENETIC TESTING AND MOLECULAR BIOMARKERS*, v. 14, n. 4, p. 565–569, 2010.

WAITUMBI, J.N. *et al.* Hb G-Philadelphia or Stanleyville II? When the phenotype and genotype do not agree. *European Journal of Haematology*, v. 79, p. 177–178, 2007.

WEATHERALL, D.J. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nature Reviews. Genetics*, v. 2, n. 4, p. 245–255, 2001.

WEATHERALL, D.J.; Thalassaemia in the next millennium. *Annals of the New York Academy Sciences*, v. 850, n. 1, p. 1–9, 1989.

WENNING, M.R.S.C. *et al.* α -Globin genes: Thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, n. 9, p. 1041–1045, 2000.

WILBER, A.; NIENHUIS, A.W.; PERSONS, D.A. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities. *Blood*, v. 117, n. 15, p. 3945–3953, 2011.

ZORAI, A. *et al.* MOLECULAR SPECTRUM OF α -THALASSEMIA IN TUNISIA: EPIDEMIOLOGY AND DETECTION AT BIRTH. *HEMOGLOBIN*, v. 26, n. 4, p. 353–362, 2002.

APÊNDICE A – Instrumento de Coleta de Dados (continua)

Título do Projeto: “Estudo e identificação das hemoglobinas variantes de comportamento físico-químico semelhante ao da hemoglobina S (*S-like*) em crianças do programa nacional de triagem neonatal do estado do Rio de Janeiro”.

Nº IDENTIFICAÇÃO NO PROJETO: _____

DATA: _____

INICIAIS DO PACIENTE: _____

NOME DO RESPONSÁVEL: _____

Nº PRONTUÁRIO HEMORIO: _____

ENDEREÇO: _____

TELEFONE(S): _____

DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____ SEXO: () MASC () FEM

IDADE NA ADMISSÃO NO HEMORIO: _____

NATURALIDADE: _____

GRUPO ÉTNICO: () BRANCO () PARDO () NEGRO () ORIENTAL

MÉDICO: _____

OBSERVAÇÕES: _____

APÊNDICE A – Instrumento de Coleta de Dados (conclusão)EXAMES LABORATORIAIS

DATA: _____

HEMOGRAMA:Hem: _____ x 10¹²/ L

VGM: _____ fL

Hb: _____ g/ dL

HGM: _____ pg

Ht: _____ %

CHGM: _____ g/ dL

RDW: _____ %

Hematoscopia: _____

RETICULÓCITOS: _____ % (_____ x 10⁹/L)ELETROFORESE DE HEMOGLOBINAS:

pH alcalino: _____

pH ácido: _____

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC):

Hb A: _____ %

Hb A₂: _____ %

Hb F: _____ %

Hb Variante (_____): _____ %

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (continua)

Senhor Responsável, o menor pelo qual o Sr.(a) responde, está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa: “Estudo e identificação das hemoglobinas variantes de comportamento físico-químico semelhante ao da hemoglobina S (*S-like*) em crianças do programa nacional de triagem neonatal do estado do Rio de Janeiro (PNTN- RJ)”.

Normalmente, a maioria das pessoas apresenta a hemoglobina A como a principal hemoglobina nos glóbulos vermelhos (hemácias). Entretanto algumas pessoas apresentam uma mudança no DNA, também denominada de mutação que resulta em uma hemoglobina diferente, chamada de variante. No Brasil, a hemoglobina S, responsável pela anemia falciforme (exame realizado no teste do pezinho), uma doença hereditária, é a variante mais comum. Existem no mundo por volta de 1250 hemoglobinas variantes.

A maior parte dessas hemoglobinas variantes incomuns são clinicamente irrelevantes, porém existem algumas, que apresentam manifestações hematológicas e importância clínica, além da possibilidade de serem confundidas com a hemoglobina S, presente na anemia falciforme. Esse estudo genético contribuirá para verificar a importância clínica dessas variantes incomuns e evitar o falso diagnóstico de doença falciforme; a identificação das hemoglobinas variantes que ocorrem no Rio de Janeiro bem como a possibilidade da identificação de novas variantes.

O procedimento realizado para a participação do menor no estudo, é a necessidade de coleta de nova amostra de sangue, para a análise do mesmo.

O procedimento será realizado por profissionais treinados e qualificados, tendo apenas como desconforto na participação da pesquisa a coleta de sangue. Em casos raros, pode aparecer algum hematoma na região de penetração da agulha usada na coleta do sangue. Qualquer problema que apareça no seu exame, você será orientado e direcionado para uma consulta médica.

Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participação do menor, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A autorização da participação na pesquisa é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade.

O (s) pesquisador (es) irá (ão) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e os resultados dos seus exames permanecerão confidenciais.

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (conclusão)

A participação do menor no estudo não acarretará custos para o Sr. Responsável e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

Eu, _____ (pai, mãe ou responsável) do menor _____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Autorizo a minha participação do menor o qual sou responsável e a coleta de sangue. Estou ciente também que não sou obrigado (a) a dar essa autorização e, se o faço, não me sinto coagido (a) a fazê-lo. Foi garantido a mim que se desejar retirar meu consentimento a qualquer momento e a não autorização para realização dos procedimentos não trará nenhum prejuízo para mim ou minha família.

Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante
Local	Data

Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Arthur de Siqueira Cavalcanti (HEMORIO)

Endereço: Rua Frei Caneca, 8 - Centro, Rio de Janeiro - RJ, 20211-030.
Telefone: (21) 2332-8611

Pesquisador: Marcos Isaac Esquenazi - Tel: (21) 3938 - 6411

Coordenadores da Pesquisa:

Prof. PhD Paulo Murillo Neufeld - Tel (21) 3938 6421

Prof. PhD Marcos Kneip Fleury - Tel: (21) 3938 6411

ANEXO A – Parecer consubstanciado de projeto de pesquisa aprovado pelo CEP Hemorio (continua)



GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HEMORIO

Rio de Janeiro, 21 de Outubro de 2016.

ASSUNTO: Parecer consubstanciado de projeto de pesquisa avaliado pelo CEP HEMORIO

Prezado Pesquisador,

O projeto "*Estudo e identificação da hemoglobinas variantes de comportamento físico-químico semelhante ao da hemoglobina S (S-LIKE) em crianças do programa nacional de triagem neonatal do Estado do Rio de Janeiro (PNTN-RJ)*", registrado no CEP HEMORIO sob o número 405/16, foi apresentado de acordo com a Resolução 466/12. Assim, após apresentação e análise dos documentos recebidos, o Comitê de Ética em Pesquisa HEMORIO considera o projeto **APROVADO**.

Ressaltamos abaixo, algumas orientações fundamentais, as quais o pesquisador deve estar muito atento:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado;
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeira ação imediata;
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificações ao CEP e à ANVISA, junto com seu posicionamento;
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente até **21/04/2017** e ao término do estudo.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rua Frei Caneca, 8 – Centro – Rio de Janeiro – CEP 20211-030

Tel: (21) 2289-5442 R. 2210 – Fax: 2242-4265 – www.hemorio.rj.gov.br – cep@hemorio.rj.gov.br

ANEXO A – Parecer consubstanciado de projeto de pesquisa aprovado pelo CEP Hemorio (conclusão)



GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE



Sendo assim, por favor, contate a Coordenação do CEP HEMORIO (Sra. Marcia Villa Nova, Thaís Oliveira ou Joselaine Sousa) pelo telefone 2332-8612, ramal 2415, a fim de estabelecermos o fluxo de sua pesquisa e tomarmos outras providências pertinentes.

Atenciosamente,

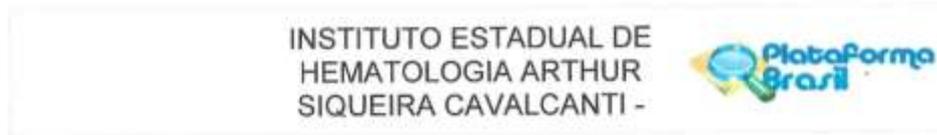

Marcia Villa Nova
Coordenadora do CEP HEMORIO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rua Frei Canada, 8 – Centro – Rio de Janeiro - CEP 20211-010

Tel. (21) 2399-0442 R. 2215 – Fax: 2342-4250 – www.hemorio.rj.gov.br – cep@hemorio.rj.gov.br

ANEXO B - Parecer de aprovação no CEP – Hemorio (continua)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO E IDENTIFICAÇÃO DAS HEMOGLOBINAS VARIANTES INDETERMINADAS DE COMPORTAMENTO FÍSICO-QUÍMICO SEMELHANTE AO DA HEMOGLOBINA S (S-LIKE) EM CRIANÇAS DO PROGRAMA NACIONAL DE TRIAGEM NEONATAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (PNTN-RJ).

Pesquisador: Marcos Isaac Esquenazi

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 61993416.7.0000.5267

Instituição Proponente: Instituto Estadual de Hematologia Arthur Siqueira Cavalcanti - HEMORIO

Patrocinador Principal: Faculdade de Farmácia

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.820.981

Apresentação do Projeto:

Apresentado.

Objetivo da Pesquisa:

Apresentado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Apresentado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Apresentado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Parecer de acordo com as normas do CEP HEMORIO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Frei Caneca nº 08 SALA316
 Bairro: Centro CEP: 20.211-030
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)2332-8611 Fax: (21)2333-3638 E-mail: cep@hemorio.rj.gov.br

ANEXO B - Parecer de aprovação no CEP – Hemorio (continua)

INSTITUTO ESTADUAL DE
HEMATOLOGIA ARTHUR
SIQUEIRA CAVALCANTI -



Continuação do Parecer: 1.820.981

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P ROJETO_490599.pdf	16/11/2016 02:34:39		Aceito
Outros	Coleta_dados_hemorio.docx	16/11/2016 02:33:26	Marcos Isaac Esquenazi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declar_PGMoura.pdf	16/11/2016 02:28:15	Marcos Isaac Esquenazi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Respons.docx	16/11/2016 02:25:45	Marcos Isaac Esquenazi	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto_pbrasil.pdf	29/06/2016 01:34:28	Marcos Isaac Esquenazi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Hemorio.pdf	28/06/2016 11:44:44	Marcos Isaac Esquenazi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_Hemorio.pdf	20/06/2016 23:40:51	Marcos Isaac Esquenazi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Partic_IBEx.pdf	20/06/2016 23:31:10	Marcos Isaac Esquenazi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Partic_lacfar.pdf	20/06/2016 23:27:54	Marcos Isaac Esquenazi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Partic_Tatiana.pdf	20/06/2016 23:26:22	Marcos Isaac Esquenazi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Compromisso_utilizados.pdf	20/06/2016 23:24:17	Marcos Isaac Esquenazi	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Armazen_mbiol.pdf	20/06/2016 23:21:07	Marcos Isaac Esquenazi	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Frei Caneca nº 08 SALA316
 Bairro: Centro CEP: 20.211-030
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)2332-8611 Fax: (21)2333-3538 E-mail: cep@hemorio.rj.gov.br

ANEXO B - Parecer de aprovação no CEP – Hemorio (conclusão)

INSTITUTO ESTADUAL DE
HEMATOLOGIA ARTHUR
SIQUEIRA CAVALCANTI -



Continuação do Parecer: 1.820.991

RIO DE JANEIRO, 16 de Novembro de 2016

Assinado por:
MARCIA VILLA NOVA
(Coordenador)

Endereço: Rua Frei Caneca nº 08 SALA316
Bairro: Centro CEP: 20.211-030
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2332-8611 Fax: (21)2333-3638 E-mail: cep@hemorio.rj.gov.br

ANEXO C – Declaração de participação do LACFAR no projeto de pesquisa**DECLARAÇÃO DA INSTITUIÇÃO PARTICIPANTE PARA REALIZAÇÃO DA PESQUISA****(RESOLUÇÃO 466/2012 – CNS/CONEP)**

Declaro para o Comitê de Ética em Pesquisa Clínica do Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti – HEMORIO que estou ciente da participação do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia (LACFAR) da Universidade Federal do Rio de Janeiro no projeto intitulado "Estudo e Identificação das Hemoglobinas Variantes de Comportamento físico-químico semelhante ao da Hemoglobina S (S-LIKE) em Crianças do Programa Nacional de Triagem Neonatal do Estado do Rio de Janeiro (PNTN-RJ)" sob a responsabilidade do pesquisador Marcos Isaac Esquenazi (Mestrando do programa MPSMLTF, da Universidade Estadual do Rio de Janeiro – UERJ com orientação do professor Paulo Murillo Neufeld, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

Este Laboratório está ciente de suas responsabilidades do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso na disponibilidade de recursos, no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutado, dispondo de infra-estrutura necessária para tal.

Ciente dos objetivos e da metodologia da pesquisa acima citada, concedo a anuência para seu desenvolvimento, respeitando as determinações éticas da Resolução nº 466/2012 CNS/CONEP.

Rio de Janeiro, RJ, 14 de outubro de 2015.

Marcos Kneip Fleury

Coordenador do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia
LACFAR

ANEXO D – Participação do IBEx como instituição coparticipante no projeto



MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
CML 1º RM
INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO
IBEx (Lab Microscopia Clín e Bacteriol./1894)



CARTA DE AUTORIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO CO-PARTICIPANTE PARA REALIZAÇÃO DA PESQUISA (Resolução 466/2012-CNS/CONEP)

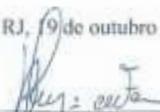
Declaro para conhecimento do Comitê de Ética em Pesquisa Clínica do Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti – HEMORIO que estou ciente da participação do Instituto de Biologia do Exército – IBEx no projeto intitulado “Estudo e identificação das hemoglobinas variantes de comportamento físico-químico semelhante ao da hemoglobina S (S-like) em crianças do programa de triagem neonatal no Estado do Rio de Janeiro (PNTN -RJ)”, sob a responsabilidade dos pesquisadores responsáveis Marcos Isaac Esquenazi (mestrando do programa MPSMLTF, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ), Paulo Murilo Neufeld e Marcos Kneip Fleury, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Esta instituição está ciente de suas co-responsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutado, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

Ciente dos objetivos e da metodologia da pesquisa acima citada, concedo a anuência para seu desenvolvimento, desde que me sejam assegurados os requisitos abaixo:

- O cumprimento das determinações éticas da Resolução nº466/2012 CNS/CONEP.
- A garantia de solicitar e receber esclarecimentos antes, durante e depois do desenvolvimento da pesquisa.
- No caso do não cumprimento dos itens acima, a liberdade de retirar minha anuência a qualquer momento da pesquisa sem penalização alguma.

Rio de Janeiro, RJ, 19 de outubro de 2015.


LÚCIO APARECIDO LUIZ - CEL

Diretor do Instituto de Biologia do Exército