

**FUNDAÇÃO FACULDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE  
PORTO ALEGRE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS  
DISCIPLINA DE GENÉTICA HUMANA**

**$\beta$ -TALASSEMIA**

ALEXANDRO MURLIKI\*  
ANA PAULA BOCCASIOUS\*  
BÁRBARA VERZA\*  
CARINA GUEDES RAMOS\*  
CARLOS EDUARDO STOFFEL OVANDO\*  
DENNIS BARONI CRUZ\*  
FELIPE TEIXEIRA HERTZ\*

ORIENTADORES:  
INGRID HARTMANN\*\*  
ANA LUÍZA DA SILVA\*\*  
ELIZABETH DE CARVALHO CASTRO\*\*\*

(\* ) Acadêmicos de Medicina da 4<sup>a</sup> série da FFFCMPA;  
(\*\* ) Monitoras da Disciplina de Genética Humana da FFFCMPA, e.  
(\*\*\* ) Professora Assistente da Disciplina de Genética Humana da FFFCMPA.

Porto Alegre, novembro de 2002.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	4
ABSTRACT .....	5
1 INTRODUÇÃO .....	6
2 EPIDEMIOLOGIA .....	10
3 HEMOGLOBINA.....	12
4 BIOSÍNTESE DA HEMOGLOBINA .....	14
5 RELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO .....	21
6 ALTERAÇÕES GÊNICAS.....	27
7 DISTRIBUIÇÃO POPULACIONAL DAS ALTERAÇÕES GÊNICAS .....	44
8 CLÍNICA.....	51
9 TRATAMENTO .....	64
10 ACONSELHAMENTO GENÉTICA.....	86

11 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....88

## RESUMO

A  $\beta$ -talassemia, o distúrbio monogênico mais comum no mundo, é caracterizada pela ausência ou diminuição da síntese de cadeias da  $\beta$ -globina, produzindo alterações entre as conformações das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da hemoglobina. Do ponto de vista molecular, a  $\beta$ -talassemia é extremamente heterogênea. Duzentas e cinquenta mutações (239 não-deletérias e 19 deletéria) já foram relatadas. Cada grupo étnico possui uma variedade típica da mutação. As vinte mais freqüentes alterações genéticas, entretanto, são responsáveis por 80% dos casos de  $\beta$ -talassemia. As manifestações clínicas mais freqüentes são a anemia, o hiperesplenismo e os distúrbios do crescimento. O seu diagnóstico é feito com base em achados clínicos, laboratoriais e moleculares. O tratamento da talassemia estava, no passado, confinada apenas às transfusões e à terapia quelante do ferro. Recentemente, novos métodos terapêuticos foram desenvolvidos com base na fisiopatologia molecular da doença, sendo essa extensamente estudados. O tratamento dos pacientes  $\beta$ -talassêmicos, por isso, expandiu consideravelmente em seu número de opções.

**Palavras chaves:**  $\beta$ -talassemia, base molecular, hemoglobina, genética.

## ABSTRACT

*The  $\beta$ -thalassemia syndromes, the most common monogenic disorders in the world, are characterized by absence or decrease in  $\beta$  chain synthesis, producing an alteration in the  $\alpha$  and in the  $\beta$  chain relationship. From the molecular point of view  $\beta$ -thalassemia is very heterogeneous. 250 mutations (239 non-deleterious and 19 deleterious) have been described. Each ethnic group has a variety of mutation. The 20 more common genetic alterations are responsible for 80% of  $\beta$ -thalassemia. The diagnosis relies upon in clinical, laboratorial and molecular findings. The more frequents clinical manifestation are anemia, hiperesplenism and growth disturbance. Therapy of thalassemia has in the past been confined to transfusion and chelation. Recently, novel modes of therapy have been developed for thalassemia, based on the pathophysiology and molecular pathology of the disease, both of which have been extensively studied. Physicians caring for thalassemia patients have an increasing variety of treatment options available.*

**Keywords:**  *$\beta$ -thalassemia, molecular level, hemoglobin, and genetics.*

## 1 INTRODUÇÃO

Em 1925, Thomas Cooley e Pearl Lee descreveram uma forma severa de anemia, que acometia crianças da Itália, associada com esplenomegalia e alterações ósseas <sup>1,2,3,4</sup>. Somente cerca de 20 anos depois, é que a verdadeira característica genética da desordem foi realmente descoberta.

O termo talassemia provém da palavra grega para mar, *thalassa*, e indica que a doença foi descoberta primeiro em pessoas de origem do Mediterrâneo <sup>2, 3, 4, 5, 6</sup>.

As talassemias, coletivamente os distúrbios monogênicos humanos mais comuns do mundo, são um grupo heterogêneo de doenças da síntese da hemoglobina nas quais a mutação reduz o nível da síntese da cadeia  $\alpha$  ou  $\beta$ <sup>3,4</sup>. Essa diminuição leva a uma distorção da proporção de cadeias  $\alpha$ :  $\beta$ , o que por sua vez causa a fisiopatologia <sup>4</sup>.

A hemoglobina normal do adulto é controlada pelos genes alfa, beta, gama, delta, que comandam a formação independente de cadeia  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , que se reúnem, formando inicialmente dímeros ( $\alpha\beta$ ,  $\alpha\gamma$  e  $\alpha\delta$ ) e depois tetrâmeros, que correspondem as três hemoglobinas -  $\alpha_2\beta_2$  ou HbA,  $\alpha_2\gamma_2$  ou HbF e  $\alpha_2\delta_2$  ou HbA<sub>2</sub><sup>1</sup>.

São definidos dois grupos principais: as  $\alpha$ -talassemias e as  $\beta$ -talassemias, onde a síntese de cadeia  $\beta$  é reduzida ( $\beta^+$ ) ou ausente ( $\beta^0$ ). Há também a  $\delta\beta$ -talassemia (forma mais rara com gravidade clínica variável), dentre outras <sup>1,4</sup>. Quando um tipo de cadeia está em número diminuído, o outro tipo de cadeia, incapaz de participar da formação normal de um tetrâmero tende a formar moléculas que consistem em quatro cadeias apenas do tipo em excesso (homotetrâmeros em oposição aos heterotetrâmeros normalmente formados pelas cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ )<sup>2</sup>. A  $\beta$ -talassemia se caracteriza por redução da síntese da cadeia beta, com redução da quantidade de hemoglobina A (HbA)<sup>5,7</sup>. Dessa forma, o excesso de cadeias  $\alpha$  forma homotetrâmeros que se precipitam e danificam as membranas celulares das células precursoras das hemácias, levando a destruição prematura de eritrócitos e conseqüente anemia <sup>5</sup>. A hipocromia e a microcitose, devido às quantidades reduzidas de tetrâmeros de hemoglobina caracterizam todas as formas de  $\beta$ -talassemia <sup>7,8</sup>.

A  $\beta$ -talassemia resulta de mutações dos genes beta, presentes no cromossomo 11<sup>2</sup>. Considera-se que as pessoas com uma mutação de  $\beta$ -globina em uma cópia do cromossomo 11 (heterozigotos - redução da síntese de cadeia beta) têm  $\beta$ -talassemia minor, uma condição que envolve pouca ou nenhuma anemia, e geralmente não requer tratamento clínico. Indivíduos nos quais ambas as cópias do cromossomo levam uma mutação de  $\beta$ -globina (homozigotos - ausência da síntese de cadeia beta), desenvolvem  $\beta$ -talassemia major (também chamada anemia de Cooley), uma afecção caracterizada por anemia intensa e que exige tratamento vitalício ou pode desenvolver a condição menos grave, que se diz  $\beta$ -talassemia intermediária <sup>2, 4,7</sup>.

Como a  $\beta$ -globina não é produzida senão após o nascimento, os efeitos da  $\beta$ -talassemia major não são notados clinicamente até 2 a 6 meses de idade. Se a

condição não for tratada, pode ocorrer um substancial atraso do crescimento, sendo por isso fundamental o diagnóstico precoce nos recém-nascidos <sup>2, 4,7</sup>. A anemia hemolítica intensa causa expansão da medula óssea, que por sua vez produz mudanças esqueléticas, incluindo uma mandíbula superior e ossos da bochecha protuberantes (fácies talassêmica) e um afinamento dos ossos longos (tornando-os suscetíveis a fraturas). A hepatoesplenomegalia, icterícia e as infecções são comuns, e os pacientes com  $\beta$ -talassemia major não tratada, em geral morrem durante a primeira década de vida. A  $\beta$ -talassemia pode variar consideravelmente em gravidade, dependendo da natureza exata da mutação responsável <sup>2,4</sup>.

O diagnóstico de  $\beta$ -talassemia é realizado a partir de dados clínicos, laboratoriais e moleculares <sup>7</sup>. O diagnóstico clínico é embasado fundamentalmente na severidade da anemia que se apresenta hipocrômica microcítica nas três formas de  $\beta$ -talassemias (major, intermédia e minor), sendo a  $\beta$ -talassemia major, a mais severa <sup>2,7</sup>. O diagnóstico laboratorial requer hemograma completo, que revela redução dos índices hematimétricos proporcional ao grau da anemia; esfregaço de sangue periférico, o qual apresentará fundamentalmente hipocromia e eritroblastos; e análise da hemoglobina com diminuição da HbA e aumento da HbF na  $\beta$ -talassemia major e intermédia <sup>7,8,9</sup>. O diagnóstico molecular é feito a partir da análise do DNA através de PCR para as mutações mais freqüentes na população da qual o paciente tem origem <sup>7</sup>. Para o diagnóstico pré-natal, métodos de biologia molecular, através da análise do DNA, vêm sendo cada vez mais empregados por possuírem baixo risco para o feto e alta acurácia<sup>7,10,11</sup>, estando indicados principalmente quando ambos os pais forem portadores com a mutação no gene HBB identificada <sup>2</sup>. Poucas condições apresentam semelhança com a  $\beta$ -talassemia major ou intermédia <sup>1</sup>. Já a  $\beta$ -talassemia minor pode ser facilmente confundida com anemia por deficiência de ferro devido à anemia microcítica leve.



A talassemia não está mais confinada às áreas tropicais como era no início, quando foram feitos os primeiros relatos da doença. Desde que a talassemia começou a se apresentar em praticamente todas as partes do globo, um maior interesse a respeito da doença começou a ser despertado em grupos de pesquisadores que, há décadas, se empenham em desenvolver técnicas terapêuticas para esse grupo de doenças.

Durante as últimas décadas, os estudos sobre  $\beta$ -talassemia foram complementados com importantes descobertas na área patofisiológica, etiológica e molecular da doença.

Atualmente, como a expectativa dos pacientes afetados tem sido estendida por melhorias dos cuidados de suporte, a distribuição populacional de idade dos pacientes foi completamente alterada. Além do mais, em muitos países, o uso do diagnóstico pré-natal, baseado no DNA da criança, reduziu substancialmente o número de nascimentos de indivíduos afetados, acentuando a tendência de idade dos pacientes talassêmicos.

Modalidades terapêuticas para propiciar o suporte ou a cura da doença têm sido desenvolvidas e multiplicadas a cada ano, proporcionando uma ampla gama de opções terapêuticas, algumas atualmente em uso, outras para serem aplicadas futuramente.

Nesse novo milênio, os clínicos que se dedicam ao tratamento de pacientes com  $\beta$ -talassemia poderão dispor de novos métodos terapêuticos, mas eles terão também uma população de pacientes mais idosa e complexa.

## 2 EPIDEMIOLOGIA

As talassemias são os distúrbios genéticos mais comuns no mundo, atingindo quase 200 milhões de pessoas <sup>2</sup>. Há uma distribuição típica das talassemias numa faixa ao redor do velho mundo: no Mediterrâneo, partes da África, Oriente Médio, Índia, Paquistão, Myanmar, sul da antiga União Soviética e sudeste da Ásia, incluindo sul da China e Indonésia <sup>2,3,4,5,6,7,12</sup>. No entanto, devido à migração populacional e, em menor parte, ao comércio escravo, a  $\beta$ -talassemia é, atualmente, também comum na Europa do Norte, Norte e Sul da América, Caribe e Austrália <sup>7</sup>. A  $\alpha$  e a  $\beta$ -talassemia têm uma alta frequência em regiões tropicais, supostamente em virtude da vantagem protetora contra a malária conferida aos portadores, o que reflete uma vantagem da sobrevivência seletiva para as hemácias anormais, as quais fornecem, supostamente, um meio menos favorável durante os estágios intra-eritrocitários do ciclo evolutivo do parasito *Plasmodium falciparum* <sup>2,3,4,13</sup>.

A  $\beta$ -talassemia tem uma incidência de 10 a 15% nos indivíduos do Mediterrâneo e do sudeste Asiático e 0,8% nos norte-americanos negros <sup>14</sup>. Nos negros, a  $\beta$ -talassemia geralmente não é tão grave <sup>14</sup>. Uma alta incidência é reportada no Chipre (14%) e na ilha da Sardenha (12%), provavelmente devido à vantagem protetora contra a malária. O número de casos graves de talassemia nos EUA é de cerca de 1000<sup>15</sup>. No entanto, a  $\beta$ -talassemia ocorre esporadicamente em

todos os grupos raciais e o estado homozigoto tem sido observado em pessoas de pura linhagem Anglo-Saxônica<sup>3</sup>.

### 3 HEMOGLOBINA

A hemoglobina contém quatro cadeias polipeptídicas e quatro grupos prostéticos heme, no qual os átomos de ferro estão no estado ferroso. A porção protéica chamada globina consiste de duas cadeias  $\alpha$  (cada uma com 141 resíduos de aminoácidos) e duas cadeias  $\beta$  (cada uma com 146 resíduos).

A molécula da hemoglobina é grosseiramente esférica, com um diâmetro de aproximadamente 5,5 nm. As quatro cadeias polipeptídicas na hemoglobina unem-se em um arranjo aproximadamente tetraédrico. Um grupo heme está ligado a cada uma das cadeias polipeptídicas da hemoglobina <sup>15</sup>.

As mudanças conformacionais da hemoglobina alteram a sua capacidade de ligação com o oxigênio. Quando a primeira subunidade heme-polipeptídica liga-se à molécula de  $O_2$  ela comunica esta informação às subunidades restantes através de interações que ocorrem nas interfaces entre elas. As subunidades respondem aumentando muito sua afinidade pelo oxigênio. Esta resposta envolve uma mudança na conformação da hemoglobina que ocorre quando o oxigênio liga-se a ela. Esta comunicação entre as quatro subunidades heme-polipeptídicas da hemoglobina é o

resultado da cooperação interativa entre as subunidades. Como uma molécula de  $O_2$  ligada aumenta a probabilidade de outras moléculas de  $O_2$  serem também ligadas pelas subunidades restantes, a hemoglobina é dita possuir cooperatividade positiva

## 4 BIOSÍNTESE DA HEMOGLOBINA

### 4.1 GENÉTICA

Nos humanos há oito diferentes loci gênicos que codificam seis genes da globina. Além disso, há pelo menos três pseudogenes que têm seqüências similares a outros genes da globina, mas diferem por não expressarem as proteínas da globina<sup>17</sup>. Normalmente, os tetrâmeros da globina são formados por duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias não  $\alpha$ . Desde que os humanos são diplóides, que possuem um par de cada autossomo, eles têm dois genes para cada locus autossômico. Por exemplo, há dois loci que codificam a estrutura da cadeia  $\alpha$ , então temos quatro genes para a cadeia  $\alpha$ . Em contrapartida, há somente um único locus para a  $\beta$ -globina, tendo então somente dois genes que codificam a cadeia  $\beta$ . Os números relativos ao locus de  $\alpha$  e  $\beta$  são importantes para entender a diferença do padrão de herança da  $\alpha$  e da  $\beta$ -talassemia, assim como a quantidade diferente das mutações da hemoglobina em pessoas que carregam genes  $\alpha$  ou  $\beta$ -globina mutados. Essas diferenças quantitativas se correlacionam diretamente com a severidade clínica dos vários distúrbios.

A região do cromossomo 11 (11p15.5) que contém os genes do tipo  $\beta$  ( $\epsilon$ ,  $G\gamma$ ,  $A\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\beta$ ) tem sido minuciosamente mapeada, por análise de endonucleases de restrição

e seqüenciado. Cada um dos genes contém duas seqüências de *Introns*, também conhecidas como *Intervening sequence (IVS)*, que interrompem a seqüência de códigos na junção dos códons por aminoácidos 30-31 e 104-105. O primeiro *Intron*, (IVS-1), tem 122-130 pares de base (pb), enquanto o segundo, (IVS-2) tem 850-904 pb de comprimento. O grupo todo do gene  $\beta$  possui 50 quilobases (kb) e contém um locus  $\epsilon$ , dois  $\gamma$  e  $\delta$ , um  $\beta$  e mais um pseudogene. O pseudogene ( $\psi\beta$ ) tem seqüências similares às seqüências do gene da cadeia  $\beta$ , mas difere em ter seqüências alternadas que previnem a produção de cadeias da globina funcionais. Pseudogenes compreendem a minoria da seqüência de genes únicos, *single*, em ambas as regiões dos genes  $\alpha$  e  $\beta$ . A seqüência de genes únicos em volta compreende apenas 7 kb dos 50 kb do DNA na região do gen- $\beta$ , enquanto os restantes 43 kb são seqüências flanqueadas, na qual presumivelmente tem algumas voltas regulatórias desconhecidas. Em consideração a isso, nucleotídeos com 4 kb 5' para o locus  $\delta$  são considerados importantes na regulação do gen  $\gamma$ , desde que a deleção em algumas formas persistentes de herança da hemoglobina fetal é associada com o aumento da expressão do gen  $\gamma$ .

Conseqüentemente, os eritrócitos têm mostrado em fator de transcrição específico (GATA-1), que é um membro de uma família de proteínas que reconhece a seqüência (T/A) GATA (A/G). O fator GATA de transcrição que forma cadeias está localizado nos promotores e acentuadores, *enhancers*, da globina e outros genes específicos dos eritrócitos. Um erro na formação de GATA-1 gera uma mutação na cadeia que é implicada como a causa de um dos tipos de persistência hereditária da hemoglobina fetal. A figura a seguir demonstra, esquematicamente, a seqüência de nucleotídeos do gene completo da  $\beta$ -globina humana:

**ACAUUUGCUUCUGACACAACUGUGUUCACUAGCAACCUCAAACAGACACCAUGGUGCACCUGACUCCUGAGGAGAAG**  
 (met) val his leu thr pro glu glu lys  
 1 5

**UCUGCCGUUACUGCCCUGUGGGGCAAGGUGAACGUGGAUGAAGUUGGUGGUGAGGCCUGGGCAGUUGGUUCAAG**  
 ser ala val thr ala leu trp gly lys val asn val asp glu val gly gly glu ala leu gly arg  
 10 15 20 25 30

**GUUACAAGACAGGUUUUAGGAGACCAAUAGAAACUGGGCAUGUGGAGACAGAGAAGACUCUUGGGUUUCUGAUAGGC**

**ACUGACUCUCUCUGCCAUUGGUCUAAUUUCCACCCUUAGGCUGCUGGUGGUCUACCCUUGGACCCAGAGGUUCUUU**  
 leu leu val val tyr pro trp thr gln arg phe phe  
 31 35 40

**GAGUCCUUUGGGGAUCUGUCCACUCCUGAUGCUGUUAUGGGCAACCCUAAGGUGAAGGCUCAUGGCAAGAAAGUG**  
 glu ser phe gly asp leu ser thr pro asp ala val met gly asn pro lys val lys ala his gly lys lys val  
 45 50 55 60 65

**CUCGGUGCCUUUAGUGAUGGCCUGGCUCACCGGACAACCUC AAGGGCACC UUUGCCACACUGAGUGAGCUGCAC**  
 leu gly ala phe ser asp gly leu ala his leu asp asn leu lys gly thr phe ala thr leu ser glu leu his  
 70 75 80 85 90

**UGUGACAAGCUGCACGUGGAUCCUGAGAACUUCAGGGUAGUCUAUGGGACCCUUGAUGUUUUUUUCCCUUCUUU**  
 cys asp lys leu his val asp pro glu asn phe arg  
 95 100 104

**UCUAUGGUUAAGUUCAUGUCAUAGGAAGGGGAGAAGUAACAGGGUACAGUUUJAGAAUGGGAAACAGACGAUUAUG**

**CAUCAGUGUGGAAGUCUCAGGAUCGUUUUAGUUUCUUUUUUUUUGCUGUUCUAACA AUUGUGUAUAACAAAAGGAAAU**

**AUCUCUGAGAUACAUAUAAGUAACUAAAAAAAAACUUUACACAGUCUGCCUAGUACAUUACU AUUUUGGAAUAUAUGUG**

**UGC UUUUUUGCAUAUUCAUAAUCUCCCUACUUU AUUUUCUUUU AUUUUAAUUGAUACAUAUUCAUUAUACA UUUUAUG**

**GGUUAAGUGUA AUGUUUUAUAUUGUGUACACAUAUUGACCAAUCAGGGUAAUUUGCAUUUGUAUUUUAAAAAAAAU**

**GCUUUCU CUUUUUAUAUACUUUUUUGUUAUCUUAUUUCUAAUACUUUCCUAAUCUCUUUCUUUCAGGGCAUAUAUGA**

**UACAAUGUAUCAUGCCUCUUGCACCAUUCUAAAGAAUAACAGUGAUAAUUUCUGGGUUAAGGCAAUAGCAAUUUU**

**CUGCAUAUAAAUAUUUCUGCAUAUAAAUUGUAACUGAUGUAAGAGGUUCAUAUUGCUAAUAGCAGCUACA AUCCAG**

**CUACCAUUCUGCUUUU AUUUUAUGGUUGGGUAUAGGCUGGAUUAUUCUGAGUCCAAGCUAGGCCUUUUGCUAAUCAU**

**GUUCAUACCUCUUAUCUUCUCCACAGCUCUCCUGGGCAACGUGCUGGUCUGUGUGCUGGCCAUACAUUUGGCAAA**  
 leu leu gly asn val leu val cys val leu ala his his phe gly lys  
 105 110 115 120

**GAAUUCACCCACCCAGUGCAGGCUGCCUAUCAGAAAAGUGGUGGCUGGUGUGGCUAAUGCCCUGGCCACAAGUAU**  
 glu phe thr pro pro val gln ala ala tyr gln lys val val ala gly val ala asn ala leu ala his lys tyr  
 125 130 135 140 145

**CACUAAGCUCGCUUUCUUGCUGUCCA AUUUCU AUUAAAAGGUUCCUUUGUCCCUAAGUCCAACUACUAAAACUGGGGG**  
 his **TER**

**AUAUUAUGAAGGGCCUUGAGCAUCUGGAUUCUGCCUAAUAAAAAACAUUUAUUUCAUUUGC**

**Figura 1:** Demonstra, de forma esquemática, a seqüência de nucleotídeos formadores do gene da  $\beta$ -globina. Os nucleotídeos apresentados em rosa são aqueles que fazem parte dos *Introns*. Já aqueles representados em azul demarcam os locais de início e fim do *Splice*, ou seja, onde ocorre a excisão, para retirada dos *Introns*, e conseqüente formação do RNA mensageiro. O primeiro AUG é traduzido como uma metionina, mas, no final do processo é removido da cadeia polipeptídica, sendo então, a valina o primeiro aminoácido da cadeia polipeptídica madura.

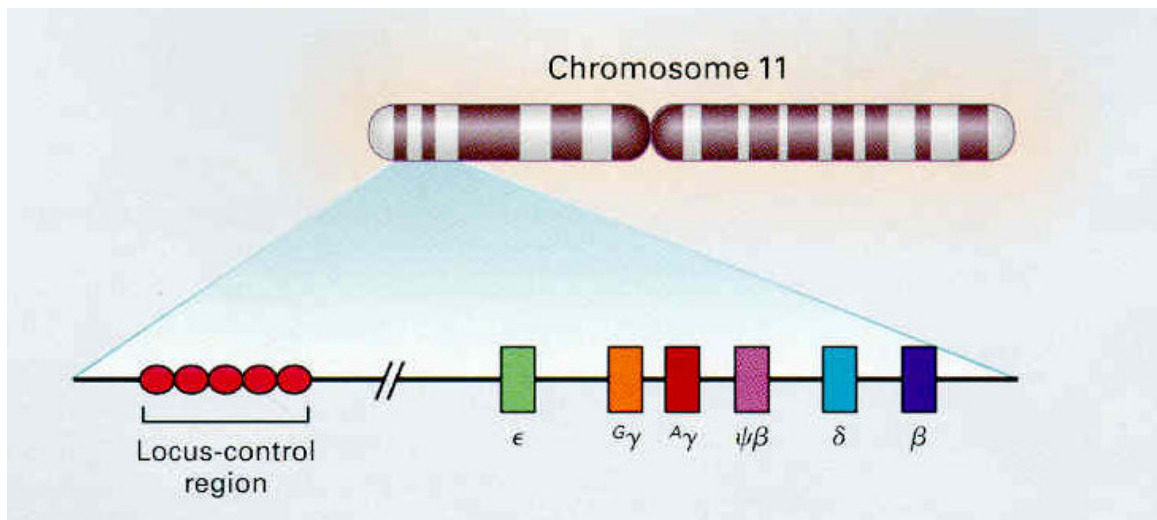


O locus  $\beta$  que controla a região, ou LCR- $\beta$ , é achado nos grupamentos de DNase I de cadeias de 6 –18 kb a partir de extremidade 5' para o gen  $\epsilon$ -globina. O LCR- $\beta$  permite que se expresse uma cadeia pesada específica dos eritrócitos do grupo de genes da  $\beta$ -globina, dependendo da posição relativa desses genes ao LCR- $\beta$ .

O complexo gene- $\alpha$  contém 2 locus  $\alpha$  que tem 3,6 kb entre os centros,  $\xi$  locus, um locus pseudo  $\alpha$  ( $\psi \alpha_t$ ), e um locus pseudo  $\xi$ . O locus pseudo  $\xi$  resulta da substituição de um nucleotídeo não pareado que é polimórfico em algumas populações. Assim alguns indivíduos têm um locus  $\psi\xi$ , e outros têm um segundo gen  $\xi$  funcional da cadeia. No complexo que está no cromossomo 16 há aproximadamente 4 kb que separam o locus  $\xi$ ,  $\psi\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ , sugerindo a existência de uma duplicação discreta de unidades no DNA. Os genes- têm seqüências de *Introns* menores do que são achados nos genes  $\beta$ ; IVS-1 tem 114 pares de base, enquanto IVS-2 contém 132 kb. Há uma região controladora da  $\alpha$ -globina chamada LCR- $\alpha$  para o grupo de gen- $\alpha$ , que causou  $\alpha$ -talassemia por inativação adjacente intacto do gen do  $\alpha$ -globina.

#### 4.2 **ONTOGENIA**

Os genes da globina são expressos em tempos diferentes e em quantias relativa diferentes durante o desenvolvimento humano. Assim, a estrutura da hemoglobina humana muda durante o desenvolvimento <sup>18,19</sup>. Cada tipo de hemoglobina consiste em dois pares de cadeias polipeptídicas e os genes da  $\beta$ -globina <sup>18</sup> são encontrados em grupos no cromossomo 11, como mostra a figura que segue.



**Figura 2:** demonstração esquemática da localização do gene da  $\beta$ -globina no braço curto do cromossomo 11.

A seqüência em que aparecem as várias cadeias de globina ajuda a entender a cronologia de uma seqüência das manifestações clínicas das hemoglobinopatias e talassemias. Por exemplo, a deficiência da síntese da cadeia  $\alpha$  ou  $\gamma$  ou mutações  $\alpha$  ou  $\gamma$  com funções anormais devem ser observadas no nascimento, enquanto a deficiência da cadeia  $\beta$  pode não causar sintomas até muitos meses de idade. Finalmente, níveis de mutações da cadeia  $\beta$ , como HbS, aumenta progressivamente nos primeiros meses, então um período de manifestações clínicas podem ser atrasadas até após os 6 meses do primeiro ano de vida <sup>17</sup>.

#### 4.3 **BIOSSÍNTESE DA GLOBINA**

A informação genética por muitas cadeias de globina normais e anormais é

codificada na seqüência de nucleotídeos do DNA. Essas seqüências ou genes estão localizados no lócus específico no cromossomo 16 e 11.

Como mencionado acima, *Introns* estão localizados entre as porções de genes globina que são traduzidos em proteínas. Esses *Introns* estão presentes no gen e no RNA transcrito do gen que é chamado RNA mensageiro precursor (pré-RNA<sub>m</sub>). O pré-RNA<sub>m</sub> sofre transformações excisionais da seqüência que interfere e emenda (*splicing*) das porções traduzidas. Estudos da função do *Intron* híbrido genes 40-β-globina nas células renais dos macacos em cultura sugerem que a excisão deste é crucial para o RNA<sub>m</sub> seja transportado do núcleo para o citoplasma.

Processos mais avançados ocorrem no final de cada molécula de RNA. Na terminação 5', ou 5'-UTR, uma guanina é adicionada numa ligação trifosfato especial, e essa guanina e os próximos 2 nucleotídeos são então metilados. Essas terminações 5' modificadas são chamadas tamponadas (*capping*) e metiladas e, enquanto a função deles não está completamente esclarecida, elas têm se mostrado vitais para a iniciação da tradução de muitos RNA mensageiros, incluindo o RNA<sub>m</sub> da globina. A terminação 3', ou 3'-UTR, modificada envolve a adição de aproximadamente 150 adeninas, ou cauda poli-A. A adição da Poli-A pode ser importante para o transporte de RNA<sub>m</sub> até o citoplasma e subsequente estabilidade. Com o tempo a cauda Poli-A do RNA<sub>m</sub> encurta.

Uma vez que o RNA<sub>m</sub> foi processado, é transportado para o citoplasma e ligado aos ribossomos. O primeiro passo da tradução (iniciação) requer uma ligação do RNA<sub>m</sub> a 2 subunidades do ribossomo, amino acil-RNA, guanosina trifosfato e fatores (*initiation protein*).

A iniciação ocorre na terminação 5' ou *capped*, do RNA<sub>m</sub> que corresponde a terminação NH<sub>2</sub>, da cadeia de globina. A síntese proteica ocorre em direção a

terminação COOH. Quatro a 6 cadeias de comprimento variado (cadeia nascente sofrem traduções no mesmo RNAm simultaneamente. Quando essas cadeias nascentes estão anexadas ao comprimento total, a terminação do códon é alcançada. Desde que o RNA transportador não esteja disponível para a decodificação deste códon, a síntese do polipeptídeo é interrompida com a ajuda dos fatores término da proteína, a cadeia de polipeptídeos fica livre dos ribossomos e dos seus RNAm. Aproximadamente um terço da seqüência de RNAm maduros não é usada para tradução, mas esses nucleotídeos não traduzidos que estão localizados em ambas as terminações da molécula, podem ter outras funções reguladoras.

A cadeia de proteína assume suas estruturas secundárias e terciárias de acordo com as interações resultantes de suas seqüências de aminoácidos. Seguindo, o heme é ligado e, em combinação com outras subunidades de polipeptídeos, a molécula de hemoglobina quaternária é formada.

## 5 RELAÇÃO FENÓTIPO-GENÓTIPO

A incrível diversidade fenotípica das  $\beta$ -talassemias reflete a heterogeneidade de mutações no locus da  $\beta$ -globina, a ação de muitos secundários e terciários modificadores e a extensa gama de fatores ambientais envolvidos<sup>21</sup>.

As síndromes da  $\beta$ -talassemia constituem o paradigma molecular clássico, em que os defeitos distintos em um gene estrutural eucariótico podem culminar em redução ou, até mesmo, ausência da produção de cadeias polipeptídicas ( $\beta$ ). Esse grupo diverso de distúrbios é, em sua maior parte, devido a alterações de nucleotídeos isolados em um ou em ambos os genes da globina  $\beta$  ou ao seu redor<sup>22</sup>. Alguns dos mecanismos responsáveis pelo fenótipo talassêmico incluem mutações sem sentido, de deslocamento, de emenda e de poliadenilação, bem como inserções e deleções<sup>22</sup>.

As mutações que causam a talassemia podem atingir qualquer fase da via de expressão do gene de globina: transcrição, processamento do precursor do RNAm, translação e o mecanismo pós-translacional da cadeia de  $\beta$ -globina. As formas mais comuns surgem das mutações que prejudicam a união do RNAm precursor ou interrompem de forma prematura a translação do RNAm<sup>15</sup>.

As síndromes de  $\beta$ -talassemia podem ser classificadas em duas categorias: a primeira,  $\beta^0$ -talassemia, associada a uma ausência total de cadeias  $\beta$ -globina no estado homozigoto; e a Segunda,  $\beta^+$ -talassemia, caracterizada por síntese reduzida (porém detectável) de  $\beta$ -globina no estado homozigoto. A determinação da seqüência dos genes clonados de  $\beta$ -globina revelou um grande número de mutações diferentes responsáveis pela  $\beta^0$ -talassemia e  $\beta^+$ -talassemia<sup>23</sup>.

Genes da talassemia ( $\beta^+/\beta^+$  ou  $\beta^0/\beta^0$ ) apresentam manifestações clínicas mais graves, e são considerados portadores de  $\beta$ -talassemia *major*. Em alguns casos, o genótipo é  $\beta^0/\beta^+$  (duplo heterozigoto, quando os dois genitores são portadores de  $\beta^+$  e  $\beta^0$ ). A presença de um gene normal nos heterozigotos ( $\beta^+/\beta$  ou  $\beta^0/\beta$ ) geralmente permite uma síntese de cadeias de  $\beta$ -globulinas normais suficiente para que os indivíduos afetados geralmente permaneçam assintomáticos, apresentando apenas discreta anemia<sup>23</sup>. Esse quadro é denominado  $\beta$ -talassemia *minor* ou caráter  $\beta$ -talassêmico.

Um estudo realizado em Hong Kong constatou que a presença de cópias extras do gene da  $\alpha$ -globina mostrou uma piora no grau de anemia em heterozigotos para  $\beta$ -talassemia<sup>24</sup>.

Uma terceira variante caracteriza-se por um grau de gravidade intermediário, constituindo a denominada  $\beta$ -talassemia *intermédia*. A nível genético, os distúrbios intermediários são heterogêneos e incluem variantes leves de  $\beta^+$ -talassemia homozigota, algumas variantes graves da  $\beta$ -talassemia heterozigota ( $\beta^0/\beta$  ou  $\beta^+/\beta$ ) e uma dupla heterozigosidade para os genes  $\beta^+$  e  $\beta^0$  (genótipo  $\beta^+/\beta^0$ )<sup>23</sup>.

Em um estudo realizado com descendentes de italianos foram encontradas três mutações, que são certamente muito raras porque elas foram, até aquela data,

detectadas somente em um paciente único. Essas mutações consistem em: (1) Substituição T-A na posição 2 do IVS-I, em um paciente heterozigoto composto por essa mutação e pela mutação do promotor 87, (2) uma substituição G-C na posição 844 do IVS-II, em um paciente heterozigoto para essa mutação que apresentou seqüência normal no gene trans  $\beta$ -globina e (3) uma deleção de um nucleotídeo (-T) no códon 126, resultando na “*frameshift*” e “*readthrough*” da região não traduzível 5’ e, provavelmente, produzindo alongamento da molécula de Hb de 156 resíduos de aminoácidos, em um paciente heterozigoto para essa mutação com seqüência genética normal da  $\beta$ -globulina em outros lócus<sup>25</sup>.

Qualquer condição herdada ou adquirida que reduza o desequilíbrio entre a cadeia de  $\alpha$ -hemoglobina e não- $\alpha$ - hemoglobina na  $\beta$ -talassemia produz um menor grau de precipitação da cadeia  $\alpha$  da hemoglobina, e resulta em um fenótipo mais brando<sup>26</sup>.

A co-herança de alguns determinantes genéticos capazes de sustentar uma contínua produção de cadeias de gama hemoglobina (HbF) na vida adulta pode reduzir a extensão do desequilíbrio entre as cadeias  $\alpha$  e não- $\alpha$  da hemoglobina:

1. A mutação  $\beta$ -talassêmica aumenta a produção da cadeia  $\gamma$  de hemoglobina, isso ocorre em:
  - a)  $\delta\beta^0$ -talassemia, causada por deleções de variáveis tamanhos no *cluster* da  $\beta$ -globina, e
  - b) deleções que removem somente a região 5'-UTR do promotor da  $\beta$ -globina, o que resulta também em altos níveis de HbA<sub>2</sub>.
2. Co-transmissão da persistência hereditária da hemoglobina fetal (HPFH), a qual é resultado de uma única mutação puntiforme no promotor HBG $\gamma$  ou HBA $\gamma$ . A mais comum é a substituição de uma citosina por uma timina (C→T) na posição

158 acima do gene HBG $\gamma$ , a qual é silenciada em pessoas normais e na  $\beta$ -talassemia heterozigota, mas induz o aumento da produção de HbF em pacientes com estresse eritropoiético, como ocorre na  $\beta$ -talassemia homozigota. A mutação 158 G $\gamma$  está ligada ao desequilíbrio com as mutações IVSII-1 (G $\rightarrow$ A), *frameshift* 8 (-AA), e *frameshift* 6 (-A) respectivamente. Isso explica que o fenótipo brando pode resultar da herança dessas mutações.

3. A co-herança da persistência hereditária da hemoglobina fetal (HPFH) heterocelular pode estar ligada ou não ao gene *cluster* HBB. Nesta data, dois loci foram mapeados um na região Xq22.2-q22.3 e outro na 6q22.3-q23.1, mas provavelmente outros existam<sup>26</sup>.

Um estudo realizado nos Estados Unidos concluiu que os tipos de mutação na  $\beta$ -talassemia e a co-herança da  $\alpha$ -talassemia em pacientes que tiveram pelo menos um alelo do genótipo brando da  $\beta$ -talassemia são preditivos da severidade clínica da doença. Contudo, uma branda sintomatologia clínica em alguns pacientes com  $\beta^0/\beta^+$ -talassemia ou  $\beta^0$ -talassemia/HbE que não têm um haplótipo detectável da  $\alpha$ -talassemia e não ligados com XmnI ++ (no gene da G $\gamma$ -globulina) sugere que há outros fatores responsáveis pelas diferenças na severidade da doença<sup>27</sup>.

Nesse último estudo foi citada um variante talassêmica, a qual se caracteriza tanto pela síntese defeituosa como pela cadeia anormal. A título de maior elucidação se relatará brevemente duas das variantes. A primeira está relacionada à Hb Lepore, a qual surge de um *crossing over* desigual e da recombinação que funde a extremidade proximal do gene  $\delta$  a extremidade distal do gene  $\beta$  fortemente ligado. O composto resultante contém apenas o gene  $\delta\beta$  fundido. A globina Lepore ( $\delta\beta$ ) é



sintetizada pobremente, pois o gene fundido está sob controle do fraco promotor da  $\delta$ -globina. Os alelos da Hb Lepore possuem um fenótipo semelhante ao da  $\beta$ -talassemia, exceto pela presença adicional de 2-20% de Hb Lepore. Em segundo lugar vem a HbE (isto é,  $\alpha_2\beta_2^{26 \text{ glu-lis}}$ ) é extremamente comum no Camboja, na Tailândia e no Vietnã. O gene se tornou muito mais prevalente nos EUA, como resultado da imigração de indivíduos asiáticos, especialmente na Califórnia, onde a HbE é a variante mais comum detectada. A alta frequência do gene HbE pode ser resultado do fenótipo talassêmico associado à herança. Os indivíduos heterozigotos se assemelham àqueles com traços leves de  $\beta$ -talassemia. Os heterozigotos compostos para HbE e um gene da  $\beta$ -talassemia podem ter  $\beta$ -talassemia *intermédia* ou  $\beta$ -talassemia *major*, dependendo da gravidade do gene talassêmico co-herdado. O alelo  $\beta^E$  contém apenas uma única mudança de base localizada no códon 26, a qual causa a substituição de um aminoácido. Entretanto, essa mutação ativa um local de emenda oculto do RNA, gerando um RNAm da globina estruturalmente anormal que não pode ser traduzido de cerca de 50% das moléculas de pré-RNAm iniciais. Os restantes 40-50%, que são normalmente emendados, produzem RNAm funcional que é convertido em globina  $\beta^E$ , pois o RNAm maduro possui a mudança de base que altera o códon 26<sup>15</sup>.

Embora as deleções apenas do gene da  $\beta$ -globina que causam  $\beta$ -talassemia simples, sejam relativamente incomuns descreveram-se numerosas deleções maiores que removem o lócus  $\beta$  e/ou outros genes do grupo da  $\beta$ -globina. As talassemias que resultam destas deleções são chamadas de complexas e denominadas de acordo com os genes deletados – isto é,  $\delta\beta^0$ -talassemia,  $\beta$ -globina e  $\alpha\gamma\delta\beta^0$ -talassemia, e assim por diante. Duas ou mais mutações da  $\beta$ -globina muito

comuns, como as que acarretam a HbC, HbS, ou HbE, e alguns alelos da talassemia às vezes estão presentes em frequências relativamente elevadas na mesma população. Devido a isso, não é raro encontrar pessoas em certas regiões do mundo que são compostos genéticos para mutações diferentes no locus da  $\beta$ -globina, e cujos fenótipos clínicos resultam da interação dos dois distintos alelos mutantes. Por exemplo, os pacientes com alelos da anemia falciforme ( $\beta^s$ ) e da  $\beta$ -talassemia apresentam fenótipos cuja intensidade varia de acordo com a mutação da  $\beta$ -talassemia que eles herdaram; aqueles com um alelo da talassemia acentuada exibem uma doença semelhante à anemia falciforme. Uma situação parecida prevalece com compostos genéticos da HbE:  $\beta$ -talassemia<sup>4</sup>.

A HbE  $\beta$ -talassemia é a síndrome talassêmica severa mais comum nos adultos. Há dois tipos de HbE  $\beta$ -talassemia, classificadas baseadas na presença ou não de HbA, HbE $\beta^+$ -talassemia e HbE $\beta^0$ -talassemia. Em pacientes com HbE $\beta^0$ -talassemia, somente HbE e HbF estão presentes sem detectar HbA. HbE constitui entre 40-60% da hemoglobina, o resto sendo HbF. A HbA está presente na HbE $\beta^+$ -talassemia, resultando num quadro clínico mais brando que a HbE $\beta^0$ -talassemia<sup>28</sup>.

## 6 ALTERAÇÕES GÊNICAS

Nas  $\beta$ -talassemias o defeito genético básico está localizada no gene da  $\beta$ -globina. Uma vez que há somente um gene codificador para a cadeia da  $\beta$ -globina, e que está localizado no braço curto do cromossomo 11, como já explicitado, a possibilidade de ocorrência de um *crossing-over* inadequado é muito reduzida. Portanto a perda ou diminuição da função do gene da  $\beta$ -globina é, usualmente, causada por outros mecanismos<sup>29</sup>.

Existem Atualmente (Outubro, 2002) a descrição de 250 alterações gênicas diferentes, que são responsáveis de alguma forma por dificuldade ou ausência de produção da proteína sintetizada a partir do gene da  $\beta$ -globina. Dentre estas alterações estão incluídas as deleções e as mutações

As deleções, que são eventos raros, apresentam-se freqüentemente isoladas e podem ocorrer em qualquer local do gene codificador da cadeia  $\beta$ -globina, atingindo uma quantidade variável de bases. Já as mutações, que na maioria das vezes provocam substituição de pequenos nucleotídeos, ocorrem geralmente dentro de regiões específicas conhecidas como *clusters*. Todas as mutações resultam ou na ausência de síntese da cadeia da  $\beta$ -globina,  $\beta^0$ -talassemia, ou na redução desta

síntese,  $\beta^+$ -talassemia<sup>2,3,30</sup>.

## 6.1 DELEÇÕES GÊNICAS

Hoje, existem descritas 19 deleções descritas, que atingem o gene da  $\beta$ -globina. Estes eventos são caracterizados pela deleção parcial deste gene, variando muito em tamanho e em localização. As deleções são divididas em dois grupos distintos, diferenciados pela quantidade de pares de base deletados: No primeiro grupo estão as pequenas deleções, em número de 10 e, que envolvem a exclusão de desde 7 pares de base até 1.605 pares de base. No segundo grupo estão as grandes deleções, que são as 9 restantes, e envolvem um número maior que 1.605 pares de base deletados. As grandes deleções atingem sempre as regiões 3' e 5'-UTR da fita gênica da  $\beta$ -globina<sup>31,32</sup>. A tabela I demonstra as deleções conhecidas atualmente e, a população em que ela foi descrita.

Embora haja quase duas dezenas de deleções descritas envolvendo o gene da  $\beta$ -globina, estas são anormalidades de ocorrência rara<sup>3</sup>. A única exceção a este achado é a deleção encontrada em populações do Paquistão e da Índia, onde 619 pares de base localizados nas proximidades da região 3' do gene da  $\beta$ -globina são deletados. Este evento, ocorre em cerca da metade das  $\beta$ -talassemias diagnosticadas nestes dois países. Esta deleção remove a região 3'-UTR do gene mas deixa intacta a região 5'-UTR. Outras deleções de menor frequência atingem a região 5'-UTR, removendo-a, mas deixa a região 3'-UTR do gene da  $\beta$ -globina intacta, assim como os genes da cadeia  $\delta$ -globina, que estão localizados na seqüência desta fita gênica<sup>2, 3, 32</sup>.

**Tabela I:** Deleções que ocorrem no gene da  $\beta$ -globina conhecidas atualmente, fenótipo da  $\beta$ -talassemia e a população em que esta alteração foi descrita.

DELEÇÕES GENICAS NAS BETA-TALASSEMIAS	FENÓTIPO	POPULAÇÃO
7 pares de base deletados <sup>33</sup>	$\beta^0$	Indiana
17 pares de base deletados <sup>34</sup>	$\beta^0$	Indiana
25 pares de base deletados	$\beta^0$	Leste Europeu
44 pares de base deletados	$\beta^0$	Gregos
105 pares de base deletados <sup>35</sup>	$\beta^0$	Tailandesa
290 pares de base deletados	$\beta^0$	Turcos/Búlgaros
532 pares de base deletados	$\beta^0$	Negros
619 pares de base deletados	$\beta^0$	Indiana
1.393 pares de base deletados	$\beta^0$	Negros
1.605 pares de base deletados	$\beta^0$	Croácia
3,485 pares de base deletados	$\beta^0$	Tailandesa
4237 pares de base deletados	$\beta^0$	Eslovena
~7.600 pares de base deletados	$\beta^0$	Turca
10.329 pares de base deletados	$\beta^0$	Indiana
12.023 pares de base deletados	$\beta^0$	--
12.620 pares de base deletados	$\beta^0$	Alemã
~27.000 pares de base deletados	$\beta^0$	Chinesa, Vietnamita
~45.000 pares de base deletados	$\beta^0$	Maláia
~67.000 pares de base deletados	$\beta^0$	Italiana

**Modificado de:** Huisman, HJ; Carver, MFH; Baysal E. *Syllabus of Thalassemia Mutations*. Publicado por: The Sickle Cell Anemia Foundation. USA. 1997<sup>32</sup>.

Os indivíduos homozigotos para a deleção na região 3'-UTR do gene da  $\beta$ -globina apresentam-se invariavelmente com  $\beta^0$ -talassemia, pois esta região é de fundamental importância para a formação da cauda poli-A, que confere estabilidade ao RNA mensageiro. Já os heterozigotos para esta deleção, apresentam-se com aumento da hemoglobina  $A_2$  e níveis de hemoglobina F idênticos a outras  $\beta$ -talassemias. Contudo indivíduos heterozigotos para outras formas de deleção, apresentam-se com níveis elevados de hemoglobina  $A_2$ . Não está claro se o aumento produção de cadeias  $\delta$ -globina resultam do aumento da transcrição do

gene da  $\delta$ -globina, ou, se há uma diminuição na competição pelos fatores de transcrição entre este gene e, a região 5' do gene  $\beta$ <sup>29</sup>. A seguir a Figura 3 demonstra a localização de algumas deleções responsáveis pelas  $\beta$ -talassemias.

## **6.2 MUTAÇÕES GÊNICAS**

Atualmente, a maioria das  $\beta$ -talassemias são causadas por mutações não-deletérias. Cada uma destas mutações descritas, é característica de uma determinada região do globo e, afeta principalmente, mas não exclusivamente, a população desta região.

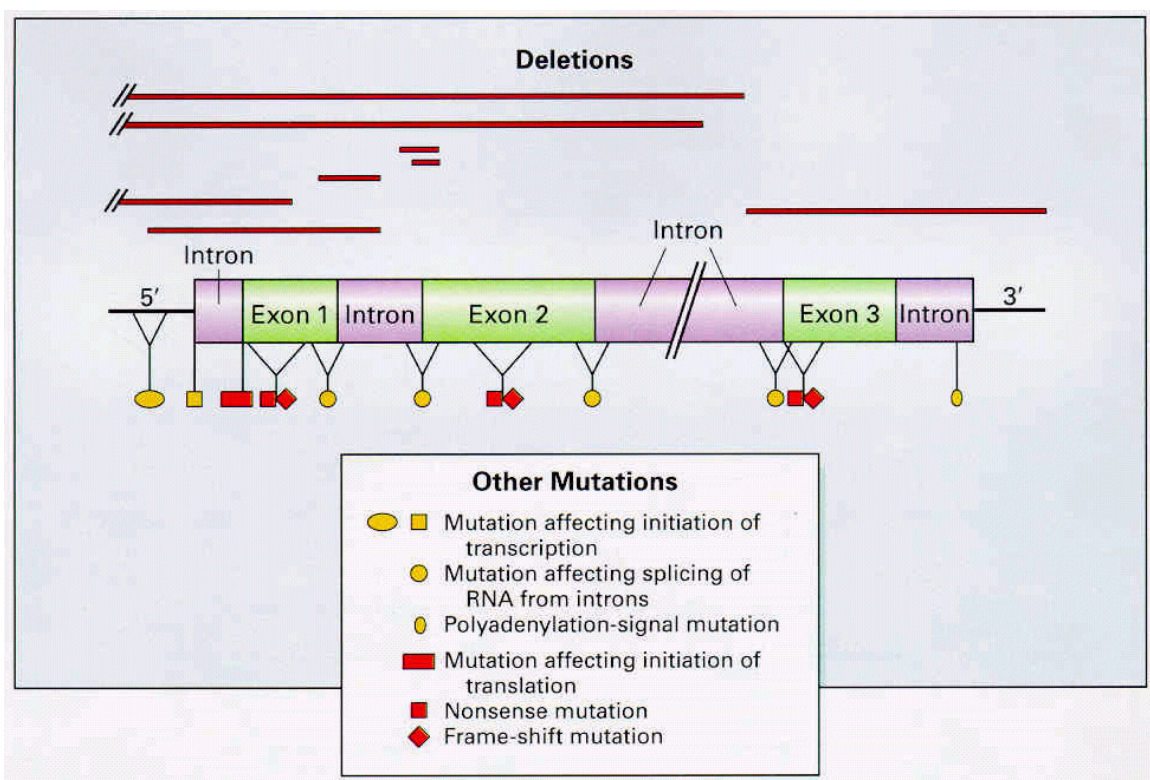
Enquanto as  $\alpha$ -talassemias são primariamente causadas por deleções gênicas, as  $\beta$ -talassemias, são, na grande maioria das vezes, resultado de uma ou mais substituições de nucleotídeos.

Atualmente, são conhecidas 231 mutações não-deletérias difentes, que atinge o gene da  $\beta$ -globina, causando alguma forma de  $\beta$ -talassemia.

Por esta ampla variedade de mutações, esta doença genética é o mais importante exemplo de heterogeneidade alélica<sup>29</sup>.

Em alguns casos o conhecimento de novas mutações no gene da  $\beta$ -globina, e as informações a seu respeito, são de difícil acesso e limitadas, já que muitas vezes, os relatos de descobertas são feitas por publicações de simples *abstracts*, correspondências ou até mesmo comunicação pessoal direta a centros de referência<sup>32</sup>.

Para que haja um melhor entendimento das mutações não-deletórias que causam  $\beta$ -talassemia, estas são divididas em subgrupos, conforme a alteração que esta causa nas várias etapas de síntese do produto do gene da  $\beta$ -globina. A seguir a figura 3 demonstra esquematicamente a estrutura do gene da  $\beta$ -globina e os principais locais em que ocorrem as mutações.



**FIGURA 3:** A estrutura esquemática normal do gene da  $\beta$ -globina e a localização e os principais tipos de mutações que resultam em  $\beta$ -talassemia. As mutações apresentadas em amarelo são aquelas em que o fenótipo resultante é sempre de uma  $\beta^+$ -talassemia. Já aqueles apresentados em vermelho resultam, invariavelmente, em um fenótipo de  $\beta^0$ -talassemia. Extraído de: Nancy F, Olivieri MD: The  $\beta$ -Thalassemia. NEJM. 341(2):99-109, 1999 <sup>2</sup>.

### 6.2.1 MUTAÇÕES TRANSCRICIONAIS

Diferentes substituições de nucleotídeos tem sido associada as constantes

alterações na seqüência do gene da  $\beta$ -globina<sup>3</sup>. Todas estas mutações estão localizadas nas proximidades da região 5'-UTR do gene da  $\beta$ -globina. A maioria delas são mutações pontuais, que estão concentradas, ou na região *TATA Box*, distante cerca de 30 nucleotídeos do *CAP Site*, ou também, nas duas seqüências CACACCC nas posições -90 e -105 em relação ao *CAP Site*<sup>2,18,84</sup>.

Algumas mutações no gene da  $\beta$ -globina estão associadas à leves alterações no fenótipo. Um exemplo é a substituição na posição -101, que troca uma citosina por uma timina (C→T), envolvendo um dos elementos promotores da transcrição. Este genótipo está associado com uma  $\beta$ -talassemia silenciosa, ou seja, um fenótipo completamente normal<sup>3</sup>. Outro exemplo é uma mutação que ocorre no *CAP site* (+1), onde a substituição de uma adenina por uma timina (A→T) leva a um fenótipo de  $\beta$ -talassemia peculiar, vista somente nas populações indianas, onde esta alteração é freqüente<sup>3</sup>.

Várias mutações puntiformes na seqüências promotoras reduzem a ligação da RNA-polimerase e, portanto, reduzem a taxa de transcrição em 75 a 80%. Como ocorre alguma síntese de  $\beta$ -globina, os pacientes desenvolvem  $\beta^+$ -talassemia<sup>23</sup>. A transcrição de  $\beta$ -globina é regulada por um promotor, dois acentuadores e por uma região antecedente conhecida como região controladora de locus (LCR). Todas estas alterações mutacionais que ocorrem na região promotora e na região 5'-UTR levam, invariavelmente, a uma da  $\beta^+$ -talassemia<sup>32</sup>.

Sendo que estas mutações confirmam a importância da conservação destas seqüências, e sua respectiva função na regulação da transcrição dos genes da  $\beta$ -globina<sup>3</sup>. A Tabela II demonstra as mutações transcricionais e as mutações em *CAP Sites*, além do respectivo fenótipo e da população onde foi caracterizada.



**Tabela II:** Mutações transcricionais conhecidas assim com as mutações em CAP Sites, além do respectivo fenótipo e da população onde foi caracterizada.

MUTAÇÃO	TALASSEMIA	POPULAÇÃO
<b>Mutações transcricionais</b>		
-101, C→T	$\beta^+$	Turca; Búlgara; Italiana
-92, C→T	$\beta^+$	Mediterrânea
-90, C→T	$\beta^+$	Portuguesa
-88, C→A	$\beta^+$	Curda
-88, C→T	$\beta^+$	Negra
-87, C→A	$\beta^+$	Negra americana
-87, C→G	$\beta^+$	Mediterrânea
-87, C→T	$\beta^+$	Alemã/Italiana
-86, C→A	$\beta^+$	Italiana
-86, C→G	$\beta^+$	Libanesa; Tailandesa
-32, C→A	$\beta^+$	Taiwanense
-31, A→C	$\beta^+$	Italiana
-31, A→G <sup>36</sup>	$\beta^+$	Japonesa
-30, T→A	$\beta^+$	Turca; Macedoniana; Búlgara
-30, T→C	$\beta^+$	Chinesa
-29, A→C <sup>37</sup>	$\beta^+$	Jordaniana
-29, A→G	$\beta^+$	Negra americana
-27, T→A <sup>38</sup>	$\beta^+$	Francesa
-28, A→C	$\beta^+$	Curda
-28, A→G	$\beta^+$	Chinesa
+8, C→T <sup>39</sup>	$\beta^+$	Chinesa
+10, -T	$\beta^+$	Grega
+22, G→A	$\beta^+$	Turca; Búlgara; Italiana
+33, C→G	$\beta^+$	Grega
+43 to +40, -AAAC	$\beta^+$	Chinesa
<b>Mutações em Cap Site</b>		
Cap +1, A→C	$\beta^+$	Indiana asiática

Modificado de: Huisman, HJ; Carver, MFH; Baysal E. *Syllabus of Thalassaemia Mutations*. Publicado por: The Sickle Cell Anemia Foundation. USA. 1997<sup>32</sup>.

### 6.2.2 MUTAÇÕES QUE ALTERAM O RNA SPLICING

As mutações que alteram o RNA *splicing* constituem a causa mais comum de  $\beta$ -talassemia. A maioria afeta *íntrons*; entretanto, algumas foram localizadas no interior de *exons*. Se a mutação alterar as junções de emenda normais, não ocorrerá *splicing*, e todo o RNAm formado será anormal. O RNAm não-emendado é degradado no interior do núcleo, resultando em  $\beta^0$ -talassemia<sup>23</sup>.

As Mutações que alteram o *RNA Splicing* podem ocorrer em qualquer uma das

*Splice Junctions*, como *Introns*, *Exons* e *Criptic Splice Sites*<sup>2</sup>.

As ligações em *Exons* e *Introns*, ou, *IVS*, são marcadas por dinucleotídeos invariantes. GT no lado 5'-UTR, ou, "lado doador" e AG no lado 3'-UTR, ou, "lado receptor". Mudanças em uma única base dentro de uma *Splice Junctions* impede totalmente o *RNA Splicing* normal, resultando em fenótipos de  $\beta^0$ -talassemia<sup>3</sup>.

Nas proximidades destes nucleotídeos invariantes, que demarcam as *Splice Junction*, existem seqüências altamente conservadas que estão envolvidas no processamento do RNA mensageiro. E diferentes variantes da  $\beta$ -talassemia envolve a substituição de um único nucleotídeo dentro da seqüência consenso do *IVS-1* "doador". Estas mutações são particularmente interessantes pois estão associadas à ocorrência de um fenótipo singular. Um exemplo disso, são as substituições da guanina da posição 5 do *IVS-1* por uma timina (G→T) ou citosina (G→C), resultando em uma  $\beta^+$ -talassemia severa. Por outro lado a troca de uma timina por uma citosina (T→C) na posição 6, comum na região mediterrânea, resulta comumente em uma forma muito leve de  $\beta^+$ -talassemia<sup>3</sup>.

O processamento do RNA também é afetado por mutações que criam um novo local de *Splice* dentro de *Exons* ou *Introns*. Nestes casos o fenótipo irá variar conforme a freqüência de uso destes novos locais de *Splice*, comparado com o normal. Um exemplo desta mutação é a substituição de uma guanina por uma adenina (G→A) na posição 110 do *IVS-1*, que é uma das formas mais comuns de  $\beta$ -talassemia na região mediterrânea, fazendo com que cerca de somente 10% dos *Splicing* ocorra nos locais normais, resultando então em uma severa  $\beta^+$ -talassemia. De forma similar, a mutação que produz um novo local de quebra na posição 116 do *IVS-1*, resulta, na maioria das vezes, em uma  $\beta^0$ -talassemia por produção insuficiente de RNA mensageiro. Varias mutações estão descritas como geradoras

de novas regiões “doadoras” dentro do IVS-2 do gene da  $\beta$ -globina<sup>3</sup>.

Outro interessante mecanismo de *Splicing* anormal é a ativação de locais “doadores” dentro dos *Exons*, como ocorre no *Cryptic donor site*, dentro *Exon 1*, na região dos códons 24-27. Este local contém um dinucleotídeo GT, onde a substituição de um nucleotídeo adjacente a ele, altera a seqüência dos nucleotídeos, tornando esta região parecida com um *Splice Site*. O resultado disso, é a ativação desta região, produzindo um anormal *Splicing* do RNA mensageiro. Há ainda uma variedade de outras mutações em *Cryptic Sites* dentro de Introns e Exons que já estão descritas.

Outra classe de mutações no processamento do RNA mensageiro incluem a sinalização das poliadenilações no local AAUAAA na região 3'-UTR do RNA mensageiro, e portanto levando a um fenótipo de uma  $\beta^+$ -talassemia severa<sup>3</sup>. A Tabela III demonstra as mutações conhecidas que alteram o processamento do RNA mensageiro, seu respectivo fenótipo e a população onde foi caracterizada.

**Tabela III:** Mutações conhecidas que alteram o processamento do RNA mensageiro agrupadas em mutações que ocorrem nas *Splice Junctions*, nas IVS-1 e IVS-2, nas regiões codificadoras, na região de poliadenilação (poli A) e na região 3'-UTR, além do respectivo fenótipo e da população onde a mutação foi caracterizada.

MUTAÇÃO	TALASSEMIA	POPULAÇÃO
<b>Mutação em Splice Junctions</b>		
IVS-I (-3), C→T (códon 29; Gly→Gly)	$\beta^+$	Libanesa
IVS-I (-2), A→G (cD 30; Arg→Gly) <sup>40</sup>	$\beta^0$	Judaíca
IVS-I (-2), A→C <sup>41</sup>	$\beta^0$	Canadense
IVS-I (-1), G→A (códon 30; Arg→Lys)	$\beta^0$	Búlgara
IVS-I (-1), G→C (códon 30; Arg→Thr)	$\beta^0$	Negra amer; Tunisianos; Indiana
IVS-I-1, G→A <sup>42</sup>	$\beta^0$	Mediterrânea; Indiana

Tabela III: Continuação...

MUTAÇÃO	TALASSEMIA	POPULAÇÃO
IVS-I-1, G→T	$\beta^0$	Indiana
IVS-II-1, G→A	$\beta^0$	Mediterrân.; Tunísianos; Negra amer.
IVS-II-1, G→C <sup>41</sup>	$\beta^0$	Iraniana, Canadense
IVS-I-2, T→A	$\beta^0$	Argelina
IVS-I-2, T→C	$\beta^0$	Negra americana
IVS-I-2, T→G	$\beta^0$	Tunísianos
IVS-II-2, (-T) <sup>43</sup>	$\beta^0$	Chinesa
IVS-II-2,3, +11 bp, -2 bp	$\beta^0$	Iraniana
IVS-I, -17 nts (3' end)	$\beta^0$	Kuwaitiana
IVS-I -91, C→T <sup>44</sup>	$\beta^0$	Italiana
IVS-I-130, G→A	$\beta^0$	Egípcia
IVS-I-130, G→C	$\beta^0$	Turca; Japonesa
IVS-I-130 (+1) G→C	$\beta^0$	Leste europeu
IVS-II-849, A→C	$\beta^0$	Negra americana
IVS-II-849, A→G	$\beta^0$	Negra americana
IVS-II-850, -G	$\beta^0$	Italiana
IVS-II-850, G→A	$\beta^0$	Ingleses- Escoceses
IVS-II-850, G→C	$\beta^0$	Iugoslavos
IVS-II-850, G→T	$\beta^0$	Japonesa
<b>Mutações em Consensus Site</b>		
IVS-I-5, G→A	$\beta^+$	Argelina; Mediterrânea
IVS-I-5, G→C	$\beta^+$	Indiana; Chinesa
IVS-I-5, G→T	$\beta^+$	Mediterrânea; Negra americana
IVS-II-4,5, -AG	$\beta^0$ ?	Portuguesa
IVS-II-5, G→C	$\beta^+$	Chinesa
IVS-I-6, T→C	$\beta^+$	Mediterrânea
IVS-I-128, T→G	$\beta^+$	Arábica Saudita
IVS-II-837, T→G	?	Indiana
IVS-II-843, T→G	$\beta^+$	Argelina
IVS-II-844, C→G	$\beta^+$	Italiana
IVS-II-848, C→A	$\beta^+$	Negra americana; Egípcia; Iraniana
IVS-II-848, C→G	$\beta^+$	Japonesa
<b>Mutações em IVS-I ou IVS-II</b>		
IVS-I-108, T→C <sup>45, 46</sup>	$\beta^+$	Cubana, Francesa
IVS-I-110, G→A	$\beta^+$	Mediterrânea

Tabela III: Continuação...

MUTAÇÃO	TALASSEMIA	POPULAÇÃO
IVS-I-116, T→G	$\beta^0$	Mediterrânea
IVS-II-591, T→C <sup>47</sup>	$\beta^+$	Indianos Asiáticos
IVS-II-654, C→T	$\beta^+$	Chinesa
IVS-II-705, T→G	$\beta^+$	Mediterrânea
IVS-II-745, C→G	$\beta^+$	Mediterrânea
<b>Mutações em regiões codificadoras</b>		
Códon 10, C→A (Ala→Ala) <sup>48</sup>	$\beta^+$	Indiana
Códon 19, A→G (Hb Malay; Asn→Ser)	$\beta^+$	Malaia
Códon 24, T→A (Gly→Gly)	$\beta^+$	Negra americana; Japonesa
Códon 26, G→A (Hb E; Glu→Lys)	$\beta^+$	Sudeste europeu
Códon 27, G→T (Hb Knossos; Ala→Ser)	$\beta^+$	Mediterrânea
<b>Mutação em regiões de Poliadenilação</b>		
AATAAA→AACAAA	$\beta^+$	Negra americana
AATAAA→AATGAA	$\beta^+$	Mediterrânea
AATAAA→AATAGA	$\beta^+$	Malaia
AATAAA→AATAAG	$\beta^+$	Curda
AATAAA→AAAA (-AT ou -TA)	$\beta^+$	Francesa
AATAAA→CATAAA <sup>49</sup>	$\beta^+$	Chinesa
AATAAA→A (-AATAA)	$\beta^+$	Arabe
<b>Mutação em 3' UTR</b>		
3'UTR +6, +1,480; C→G	$\beta^+$	Grega
3'UTR +1,565 to +1,577; -13 bp	$\beta^+ ?$	Turca
3'UTR +1,570; T→C	$\beta^+ ?$	Irlandesa

**Modificado de:** Huisman, HJ; Carver, MFH; Baysal E. *Syllabus of Thalassemia Mutations*. Publicado por: The Sickle Cell Anemia Foundation. USA. 1997<sup>32</sup>.

### 6.2.3 MUTAÇÕES QUE ALTERAM A TRANSLAÇÃO DO RNA MENSAGEIRO

#### 6.2.3.1 Mutações Nonsense

São aquelas substituições que trocam as bases de um códon que codifica um aminoácido para um códon que codifica uma terminação, impedindo a translação

correta de um RNA mensageiro. Muitas substituições deste tipo são descritas, a exemplo da mutação que ocorre no códon 17 e é comum na sudeste da Ásia. Além desta, outra mutação agora no códon 39, ocorre com alta frequência em regiões mediterrâneas. Todas as mutações *Nonsense* conhecidas atualmente resultam em fenótipos de  $\beta^0$ -talassemia. A seguir a Tabela IV demonstra as mutações *Nonsense* conhecidas assim com seu respectivo fenótipo e a população onde foi a mutação foi caracterizada<sup>3,18,30</sup>.

**Tabela IV:** Mutações *Nonsense* conhecidas, e a população onde a mutação foi caracterizada.

MUTAÇÃO	POPULAÇÃO
<b>Mutações Nonsense</b>	
Códon 15, TGG→TAG	Indiana; Turca
Códon 15, TGG→TGA	Portuguesa
Códon 17, A→T	Chinesa
Códon 22, G→T	---
Códon 26, G→T	Tailandesa
Códon 35, C→A	Tailandesa
Códon 37, G→A	Arábica Saudita; Espanhola
Códon 43, G→T	Chinesa
Códon 61, A→T	Negra
Códon 90, G→T	Japonesa
Códon 112, T→A	Slovenos

Modificado de: Huisman, HJ; Carver, MFH; Baysal E. *Syllabus of Thalassaemia Mutations*. Publicado por: The Sickle Cell Anemia Foundation. USA. 1997<sup>32</sup>.

### 6.2.3.2 Mutações Frameshift

A inserção ou deleção de um, dois ou quatro nucleotídeos na região codificadora do gene da  $\beta$ -globina interfere na normal seqüência de leitura da fita gênica. Como resultado deste evento temos a adição de aminoácidos anômalos à seqüência, podendo alterar completamente a estabilidade e a função da proteína sintetizada. Dezenas de mutações *frameshift* estão descritas, sendo que duas delas,

a inserção de um nucleotídeo entre os códons 8 e 9, e a deleção de quatro nucleotídios nos códons 41 e 42 são muito comuns Índia asiática. As mutações *Frameshift* são caracterizadas por apresentar, invariavelmente, um fenótipo de  $\beta^0$ -talassemia<sup>3,18,29,30,84</sup>. A Tabela V, abaixo, demonstra as mutações *Frameshift* conhecidas assim com seu respectivo fenótipo e a população onde foi a esta foi caracterizada.

**Tabela V:** Mutações *Frameshift* conhecidas, e a população onde a mutação foi caracterizada.

MUTAÇÃO	POPULAÇÃO
<b>Mutações Frameshift</b>	
Códon 1, -G	Mediterrânea
Códons 2/3/4, -9 bp; +31 bp	Argelina
Códon 5, -CT	Mediterrânea
Códon 6, -G <sup>50</sup>	Alemã
Códon 6, -A	Mediterrânea; Negra americana
Códon 8, -AA	Mediterrânea
Códons 8/9, +G	Indiana
Códons 9/10, +T	Grega
Códon 11, -T	Mexicanos
Códons 14/15, +G	Chinesa
Códon 15, -T	Malaia
Códon 16, -C	Indiana
Códons 22/23/24, -AAGTTGG	Turca
Códon 24, -G; +CAC	Egípcia
Códons 25/26, +T	Tunísiana
Códon 26, +T	Japonesa
Códons 27/28, +C	Chinesa
Códon 28, -C	Egípcia
Códons 28/29, -G	Japonesa; Egípcia
Códon 31, -C	Chinesa
Códon 35, -C	Malaia
Códons 36/37, -T	Iraniana; Curda
Códons 37/38/39, -GACCCAG	Turca
Códons 38/39, -C	Tcheca
Códons 38/39, -CC	Belga
Códon 40, -G	Japonesa

Tabela V: Continuação...

MUTAÇÃO	POPULAÇÃO
Códons 40/41, +T	Chinesa
Códon 41, -C	Tailandesa
Códons 41/42, -TTCT	Chinesa
Códons 42/43, +G	Japonesa
Códons 42/43, +T	Japonesa
Códon 44, -C	Curda
Códon 45, -T <sup>51</sup>	dos Emirados Árabes
Códon 47, +A	Surinameses
Códons 47/48, +ATCT	---
Códon 49 -C <sup>37</sup>	Jordaniana
Códon 51, -C	Húngara
Códons 53/54, +G	Japonesa
Códon 54, -T	Argelina; Sueca
Códons 54/55, +A	Indiana
Códon 59, -A <sup>52</sup>	Japonesa
Códons 56-60, +14 bp	---
Códons 57/58, +C	---
Códon 59, -A	Italiana
Códon 64, -G	Suiça
Códon 67, -TG	Filipina
Códons 71/72, +A	Chinesa
Códons 71/72, +T	Chinesa
Códons 72/73, -AGTGA; +T <sup>53</sup>	Inglesa
Códons 74/75, -C	Turca
Códon 76, -C	Italiana
Códon 80/81, -C <sup>54</sup>	Iraniana
Códons 82/83, -G	Azerbaijaneza; Checa; Croata
Códon 83-86, GGC/ACC/TTT/GCC→GGCC <sup>55</sup>	Japonesa
Códons 84/85, +C	Japonesa
Códons 84/85/86, +T	Japonesa
Códon 88, +T	Indiana
Códons 88, CTG→C <sup>56</sup>	Japonesa
Códons 89/90, -GT	Coreana
Códon 95, +A	Tailandesa
Códons 106/107, +G	Negra americana
Códon 113, GTG→TG <sup>56</sup>	Canadense

Modificado de: Huisman, HJ; Carver, MFH; Baysal E. *Syllabus of Thalassemia Mutations*.  
Publicado por: The Sickle Cell Anemia Foundation. USA. 1997<sup>32</sup>.



#### 6.2.4\_MUTAÇÕES NO CÓDON DE INICIAÇÃO

Mutações que envolvem a iniciação, alongação ou terminação da cadeia da  $\beta$ -globina, resultam sempre em uma  $\beta^0$ -talassemia. Já que o sinal para que ocorra a iniciação da transcrição gênica foi perdido. A Tabela VI, demonstra as mutações conhecidas que ocorrem no Códon de Iniciação. Assim com a população onde foi a mutação foi caracterizada<sup>3,18</sup>.

**Tabela VI:** Mutações conhecidas que ocorrem no Códon de Iniciação. Assim com a população onde foi a mutação foi caracterizada.

MUTAÇÃO	POPULAÇÃO
<b>Mutações que ocorrem no Códon de Iniciação</b>	
TG→GTG	Japonesa
ATG→ACG	Iugoslavos
ATG→AGG	Chinesa ; Coreana;
ATG→ATA	Italiana; Sueca
ATG→ATC	Japonesa
ATG→ATT	Iraniana

Modificado de: Huisman, HJ; Carver, MFH; Baysal E. *Syllabus of Thalassemia Mutations*. Publicado por: The Sickle Cell Anemia Foundation. USA. 1997<sup>32</sup>.

#### 6.2.5 $\beta$ -TALASSEMIA DE HERANÇA DOMINANTE

São aquelas  $\beta^+$ -talassemias de intensidade moderada à severa, onde a análise gênica demonstra mutações que envolvem o Exon-3 da  $\beta$ -globina. Estas mutações incluem alterações prematuras na terminação da cadeia, e complexos rearranjos que levam a síntese de cadeias truncadas ou alongadas, com alta instabilidade do cadeia da  $\beta$ -globina. Nos casos mais severos ocorre inclusões celulares pela deposição de cadeias precipitadas<sup>3, 30</sup>.

### 6.2.6 $\beta$ -TALASSEMIA COM CADEIAS DE $\beta$ -GLOBINA ALTAMENTE INSTÁVEIS

Algumas variantes da cadeia de  $\beta$ -globina, embora altamente instáveis, são capazes de formar um tetrâmero viável. O resultado destas cadeias instáveis na formação da hemoglobina é visto na deposição por precipitação destas cadeias dentro das hemácias ou células precursoras. Por este motivo há um espectro de condições que vão de uma  $\beta$ -talassemia de herança dominante até a similaridade de uma anemia hemolítica associada a outras formas de hemoglobinas instáveis. A seguir, a Tabela VII, demonstra as mutações conhecidas que caracterizam as  $\beta$ -talassemias de herança dominante, e aquelas caracterizadas por suas cadeias altamente instáveis, assim com seu respectivo fenótipo e a população onde foi a mutação foi caracterizada<sup>3</sup>.

**Tabela VII:** Mutações conhecidas que caracterizam as  $\beta$ -talassemias de herança dominante, e aquelas caracterizadas por suas cadeias altamente instáveis, além do respectivo fenótipo e da população onde a mutação foi caracterizada.

MUTAÇÃO	TALASSEMIA	POPULAÇÃO
<b>Mutações das <math>\beta</math>-talassemias de herança dominante, e com cadeias altamente instáveis</b>		
Códon 10, GCC→GTC <sup>57</sup>	$\beta^0$	Suíça
Códons 24/25, -GGT	$\beta^0$	Japonesa
Códon 28, CTG→CGG	$\beta^0$	(Hb Chesterfield)
Códons 31/32, +CGG	$\beta^0$	Espanhola
Códon 32, CTG→CAG (Leu→Gln);	$\beta^0$	(Hb Medicine Lake)
Códon 98, GTG→ATG (Val→Met)	?	---
Códons 33/34, -GTG	$\beta^0$	(Hb Coreana) Coreana
Códon 60, GTG→GAG (Val→Glu)	$\beta^0$	(Hb Cagliari) Italiana
Códon 94, +TG	$\beta^0$	(Hb Agnana) Italiana
Códon 100, -CTT, +TCTGAGAACTT	$\beta^0$	África do Sul
Códons 108 - 112, -12 bp <sup>50</sup>	$\beta^0$	Suéca
Códon 109, -G	?	(Hb Manhattan) Judaica
Códon 110, T→C	$\beta^0$	(Hb Showa-Yakushiji) Japonesa

**Tabela VII:** Continuação ...

MUTAÇÃO	TALASSEMIA	POPULAÇÃO
Códon 114, -CT; +G	$\beta^0$	(Hb Geneva) Francesa/Suíça
Códon 114, T→C	$\beta^0$	(Hb Durham-N.C.; Hb Brescia) Italiana
Códon 115, C→A	$\beta^0$	[Hb Hradec Kralove (Hb HK)] Checa
Códons 120/121, +A	$\beta^0$	Filipina
Códon 121, G→T	$\beta^0$	Polaca; Suíça; Japonesa; Inglesa;
Códon 123, -A	$\beta^0$	(Hb Makabe) Japonesa
Códons 123/124/125, -ACCCCACC	$\beta^0$	Tailandesa
Códon 124, -A	$\beta^0$	Russa
Códon 124/125/126, +CCA	$\beta^0$	Russa
Códon 125, -A	$\beta^0$	Japonesa
Códon 126, -T	$\beta^0$	(Hb Vercelli) Italiana
Códon 126, GTG→GGG	$\beta^0$	(Hb Neapolis) Italiana; Alemã; Tailand.
Códons 126/127/128/129/130/131, -17 bp	$\beta^0$	Paquistanesa
Códon 127, CAG→TAG (Gln→stop cd)	$\beta^0$	Inglesa
Códon 127, CAG→CCG (Gln→Pro)	$\beta^0$	(Hb Houston) Inglesa
Códon 127, CAG→CGG (Gln→Arg)	$\beta^0$	Francesa
Códons 127/128, -AGG (Gln, Ala→Pro)	$\beta^0$	(Hb Gunma) Japonesa
Códons 128, (Ala→Pro) <sup>58</sup>	$\beta^0$	Francesa
Códons 128/129, -4 bp, +5 bp and	$\beta^0$	Irlandesa
Códons 130/131 +GCCT <sup>50</sup>	$\beta^0$	Alemã
Códons 132/133/134/135, -11 bp	$\beta^0$	Irlandesa
Códons 134/135/136/137, -10 bp, +4 bp	$\beta^0$	Portuguesa

Modificado de: Huisman, HJ; Carver, MFH; Baysal E. *Syllabus of Thalassaemia Mutations*. Publicado por: The Sickle Cell Anemia Foundation. USA. 1997<sup>32</sup>.

### 6.2.7 $\beta$ -TALASSEMIA SILENCIOSA

Como mencionado anteriormente, as únicas formas de  $\beta$ -talassemia que parecem ser completamente silenciosas em heterozigotos são aquelas que causadas por mutações que envolvem a região promotora dos elementos do gene da  $\beta$ -globina<sup>3</sup>.

## 7 DISTRIBUIÇÃO POPULACIONAL DAS ALTERAÇÕES GÊNICAS MAIS FREQUENTES

As alterações gênicas mais freqüentes são aquelas que ocorrem na Europa, Oriente Médio, norte da África e sul da Ásia, também conhecido como Velho Mundo. Como já relatado estas são regiões onde há, ou houveram, grandes endemias de malária. A Figura 3 demonstra, no mapa, as áreas no mundo com maior prevalência de  $\beta$ -talassemia.



**Figura 3:** Áreas populacionais de maior prevalência de  $\beta$ -talassemia. Nota-se com clareza o predomínio dos eventos naquela região conhecida como Velho Mundo

É evidente que a grande maioria das  $\beta$ -talassemias que ocorre em populações de outras regiões, está, muita mais ligada à eventos de migração populacional, do que à eventos proporcionados pelo meio, como já discutido aqui anteriormente.

Em uma revisão de literatura, *Titus H.J et al.*<sup>32</sup> classificaram os alelos mutacionais de  $\beta$ -talassemia mais freqüentes. Demonstrou-se então os 20 eventos mutacionais mais freqüentes, responsáveis por cerca de 80% de todas  $\beta$ -talassemias. A Tabela VIII apresenta estas mutações, e a população onde elas são mais freqüentes.

**Tabela VIII:** As 20 mutações gênicas mais freqüentes, apresentadas em ordem de localização no gene.

Mutação	População
-88, C→T	Negra americana
-31, A→G	Japonesa
-29, A→G	Negra americana
-28, A→G	Chinesa; Tailandesa; Israelense
Códon 6, -A	Norte Africana
Códon 8, -AA	Oriente Médio
Codons 8/9, +G	Oriente Médio, Indiana
Códon 17, A→T	Chinesa; Tailandesa
Códon 19, A→G	Tailandesa
IVS-I-1, G→A	Norte Africana; Italiana; Grega; Oeste Europeu
IVS-I-5, G→C	Indiana; Tailandesa; Malaia; Oriente Médio
IVS-I-1, G→T	Indiana; Tailandesa
IVS-I-6, T→C	Italiana; Grega; Portuguesa
IVS-I-110, G→A	Italiana; Grega;; Israelense; Norte Africana; Oeste Europeu
Códon 39, C→T	Italiana; Grega; Norte Africana; Israelense; Oeste Europeu;
Codons 41/42, -TTCT	Chinesa; Tailandesa; Indiana; Malaia
Códon 44, -C	Israelense; Oriente Médio

**Tabela VIII:** Continuação ...

<b>Mutação</b>	<b>População</b>
Códon 90, G→T	Japonesa
IVS-II-1, G→A	Israelense; Oriente Médio; Japonesa; Turca
IVS-II-654, C→T	Chinesa; Tailandesa; Japonesa
IVS-II-745, C→G	Italiana; Grega; Turca
619 pb deletados	Indiana; Paquistanesa

Modificado de: *Huisman, HJ; Carver, MFH; Baysal E. Syllabus of Thalassemia Mutations. Publicado por: The Sickle Cell Anemia Foundation. USA. 1997*<sup>32</sup>.

Para um maior detalhe da frequência dos eventos mutacionais, e a população em estes eventos melhor se expressam, estratificamos a região do Velho mundo em cinco regiões que comportam grupos étnicos semelhantes. A seguir faremos a relação dos eventos mutacionais que envolvem mais de 50% da população daqueles países que formam aquela região.

### **7.1 REGIÃO DO MAR MEDITERRÂNEO E INGLATERRA**

Nesta região a incidência de  $\beta$ -talassemia concentra-se principalmente na Itália, Grécia, Turquia, Portugal, Espanha e França. A Inglaterra, embora fora da região do mar mediterrâneo, possui índices de prevalência próximos a desta região. A Tabela IX demonstra a frequência dos principais eventos mutacionais encontrados nestes países.

**Tabela IX:** Freqüência principais eventos mutacionais em  $\beta$ -talassemia encontrados em países do mar Mediterrâneo e Inglaterra.

<b>Mutação</b>	<b>% dos <math>\beta</math>-talassêmicos</b>	<b>Referência</b>
<b><i>Itália</i></b>		
Códon 39, C→T	66,84	
IVS-I-110, G→A	11,21	59,60,61,62,
<b><i>Grécia</i></b>		
IVS-I-110, G→A	58,32	
Códon 39, C→T	12,57	63,64
<b><i>Turquia</i></b>		
IVS-I-110, G→A	42,29	
IVS-I-6, T→C	14,75	65,66
<b><i>Portugal</i></b>		
Códon 39, C→T	34,28	
IVS-I-6, T→C	20,35	67
<b><i>Espanha</i></b>		
Códon 39, C→T	35,68	
IVS-I-1, G→A	24,31	68
<b><i>França</i></b>		
Codon 39, C→T	41,90	
IVS-I-110, G→A	25,71	69
<b><i>Inglaterra</i></b>		
Codon 39, C→T	34,78	
Codon 121, G→T	13,04	70

## **7.2 REGIÃO DO LESTE EUROPEU**

Nesta região a incidência de  $\beta$ -talassemia concentra-se principalmente na Macedônia e Bulgária:. A Tabela x.4 demonstra os principais eventos mutacionais encontrados nestes países.

**Tabela X:** Freqüência dos principais eventos mutacionais que levam a  $\beta$ -talassemia encontrados no leste Europeu.

<b>Mutação</b>	<b>% dos <math>\beta</math>-talassêmicos</b>	<b>Referência</b>
<b>Macedônia</b>		
IVS-I-110, G→A	47,30	
IVS-I-6, T→C	18,56	71
<b>Bulgária</b>		
Códon 39, C→T	26,02	
IVS-I-110, G→A	23,09	72

Nota-se, na análise destes dados, que o evento mutacional que envolve a substituição de uma citosina por uma timina (C→T) no códon 39, é o principal evento que leva a  $\beta$ -talassemia nesta região.

### 7.3 REGIÃO DO ORIENTE MÉDIO

Nesta região a incidência de  $\beta$ -talassemia concentra-se principalmente na Síria, Líbano, Jordânia e Emirados Árabes. Além destes países, Arábia Saudita, Israel, Egito, Tunísia e Argélia, demonstram valores muito parecidos nos mesmos eventos mutacionais. A Tabela x.5 mostra os principais eventos encontrados nesta região.

**Tabela XI:** Freqüência dos principais eventos mutacionais que levam à  $\beta$ -talassemia, encontrados na região do Oriente Médio.

<b>Mutação</b>	<b>% dos <math>\beta</math>-talassêmicos</b>	<b>Referência</b>
<b>Síria / Líbano</b>		
IVS-I -110(G→A)	24,0 / 17,0	
IVS-I -1 (G→A)	33,0 / 15,0	73
<b>Jordânia</b>		
IVS-I -110(G→A)	22,0	
IVS -II -1 (G→A)	19,8	73



**Tabela XI:** Frequência dos principais eventos mutacionais que levam à  $\beta$ -talassemia, encontrados na região do Oriente Médio.

Mutação	% dos $\beta$ -talassêmicos	Referência
<i>Emirados Árabes</i>		
IVS -I -5 (G→C)	55,0	73

Com exceção dos Emirados Árabes, mutação que envolve a posição 110 do *Intron 1* é a predominante nesta população.

#### 7.4 REGIÃO DA INDIA E PAQUISTÃO

Nesta região a incidência de  $\beta$ -talassemia muito é alta. A Tabela XII demonstra os principais eventos relacionados à  $\beta$ -talassemia encontrados nestes países.

**Tabela XII:** Frequência dos principais eventos mutacionais causadores de  $\beta$ -talassemia, encontrados na região da Índia e do Paquistão

Mutação	% dos $\beta$ -talassêmicos	Referência
<i>Índia</i>		
Deleção de 619 pb	29,82	74
IVS-I-5, G→C	20,17	
<i>Paquistão</i>		
IVS-I-5, G→C	37,73	75
Códons 8/9, +G	26,18	

### 7.5 REGIÃO DA CHINA E TAILÂNDIA

Nestes países a incidência de  $\beta$ -talassemia também é muito alta. A Tabela XIII demonstra os principais eventos mutacionais encontrados nestes países.

**Tabela XIII:** Freqüência dos principais eventos mutacionais que levam à  $\beta$ -talassemia, encontrados na China e Tailândia

Mutação	% dos $\beta$ -talassêmicos	Referência
<i>China</i>		
Códons 41/42, -TTCT	41,83	76,77,78
IVS-II-654, C->T	21,36	
<i>Tailândia</i>		
Códons 41/42, -TTCT	37,24	79,80,81
Códon 17, A->T	18,55	

Por ser as regiões da Índia, China, Paquistão e Tailândia locais de altos índices demográficos, é bem possível que os eventos mutacionais que ocorrem nestes países, sejam aqueles encontrados em maior número, dentre todos os tipos de alterações gênicas responsáveis por  $\beta$ -talasemias.

## 8 CLÍNICA

A cadeia  $\beta$  da hemoglobina é importante apenas no período pós-natal, diferentemente da alfa<sup>4</sup>. Assim, o início da  $\beta$ -talassemia só é evidente meses após o nascimento, quando a  $\beta$ -globina normalmente substituiria a gama globina como principal cadeia não-alfa, e apenas a síntese da principal hemoglobina adulta, HbA, é reduzida<sup>4</sup>. A severidade clínica depende da proporção entre as cadeias alfa e não-alfa da hemoglobina<sup>7</sup>.

Quando alelos da  $\beta$ -talassemia permitem uma produção tão pequena da  $\beta$ -globina que nenhuma HbA está presente, a condição é denominada  $\beta^0$ -talassemia<sup>4</sup>. Caso exista alguma quantidade de HbA detectável<sup>4</sup>, cerca de 10 a 30% da quantidade normal, é denominada  $\beta^+$ -Talassemia<sup>5</sup>.

Relação Genótipo-fenótipo: A  $\beta$ -Talassemia pode variar consideravelmente em gravidade, dependendo da natureza exata da mutação responsável<sup>5</sup>.

### 8.1 $\beta$ -TALASSEMIA MAIOR (MAJOR OU DOENÇA DE COOLEY)

Como a  $\beta$ -globina não é produzida senão após o nascimento, os efeitos da  $\beta$ -Talassemia Maior não são notados clinicamente até 2 a 6 meses de idade<sup>5</sup>. Geralmente a anemia grave não se manifesta clinicamente até 1 ano de idade, devido ao efeito protetor da hemoglobina fetal normal<sup>82</sup>. As crianças afetadas e não tratadas têm falência de desenvolvimento e expectativa de vida curta<sup>7</sup>.

As cadeias alfa em excesso são insolúveis, de modo que se precipitam em precursores eritróides<sup>4</sup>, causando dano e destruição desses precursores na medula óssea e no baço, determinando eritropoiese ineficaz<sup>7</sup>. A eritropoiese ineficaz resulta em expansão da medula óssea em um nível de 30 vezes o normal<sup>2</sup>. Esses pacientes desenvolvem anemia severa<sup>7</sup>. A anemia é hipocrômica, microcítica, hipersiderêmica, moderadamente regenerativa, com sinais de hiperhemólise, anisopoiquilocitose com células em alvo, ferropenia, pseudopoliglobulia<sup>14</sup>. Os leptócitos e pecilócitos são comuns, o RDW costuma estar aumentado e a HbA<sub>2</sub> geralmente está elevada<sup>83</sup>.

O aumento do volume plasmático, resultante da expansão da medula óssea, e a esplenomegalia progressiva exacerbam a anemia<sup>2</sup>. Além disso, a síntese de eritropoietina pode estimular a produção extramedular de tecido eritropoiético, principalmente em tórax e região paraespinal<sup>2</sup>. A esplenomegalia leve é perceptível aos 6 meses de idade<sup>82</sup>.

Crianças afetadas apresentam déficit de desenvolvimento e tornam-se progressivamente pálidas<sup>7</sup>. Distúrbios alimentares, diarreia, irritabilidade, febre recorrente, progressivo aumento abdominal por esplenomegalia são observados. Se o diagnóstico for estabelecido nesse estágio e for organizado um programa de transfusões, o desenvolvimento e o crescimento serão normais até 10-11 anos<sup>7</sup>. Depois dessa idade, há risco de severas complicações relacionadas a sobrecarga de

ferro, incluindo retardo no crescimento, falha na maturação sexual, envolvimento cardíaco (miocardiopatia dilatada ou pericardite), hepático (fibrose, cirrose), de glândulas endócrinas (DM, insuficiência de tireóides e paratireóides) e, menos freqüentemente, de hipófise e adrenais<sup>7</sup>. Pacientes submetidos a transfusões regulares têm sobrecarga de ferro, com hemossiderose transfusional<sup>7</sup>.

Outras complicações são hiperesplenismo, hepatite crônica (vírus B ou C), cirrose, AIDS, trombose venosa e osteoporose<sup>7</sup>. A sobrevida dos pacientes tratados corretamente com transfusão e agentes quelantes pode ser de 30 anos.

Pacientes sem tratamento podem apresentar retardo do crescimento e desenvolvimento visível através de exames radiológicos<sup>82</sup>, icterícia, palidez, pigmentação castanha da pele, atrofia muscular, genu valgo, hepatoesplenomegalia, úlceras de membros inferiores, massas por eritropoiese extramedular, alterações esqueléticas resultantes da expansão da medula óssea<sup>7</sup>. Essas alterações incluem deformidades dos ossos longos de membros inferiores, tornando-os mais susceptíveis a fraturas<sup>82</sup>, alterações craniofaciais típicas: alargamento dos ossos planos da face e crânio, eminência malar proeminente, depressão da ponte nasal<sup>7</sup>, aparência levemente oblíqua dos olhos, alargamento da maxila superior com protusão do lábio para cima, e exposição dos dentes superiores, proeminência dos ossos zigomáticos<sup>4</sup>. Essas alterações, somadas a protuberância frontal, caracterizam a chamada fácies talassêmica. Ao raio-X, é visualizado o espessamento da calota craniana<sup>15</sup>.

Outras alterações são adelgaçamento da fratura patológica dos ossos longos e vértebras, causada pela invasão cortical de elementos eritróides<sup>15</sup>. A anemia hemolítica intensa (Hb < 5mg/dl), causa ainda litíase vesical, ICC de alto débito<sup>15</sup>. O recrutamento de fontes calóricas para manter a eritropoiese, leva a inanição, aumento da susceptibilidade a infecções e, em casos graves, morte na primeira

década de vida. A expansão da medula óssea leva a osteopenia, agrava a síndrome periarticular dolorosa, caracterizada por microfraturas e osteomalácia, gera defeitos focais na mineralização óssea e aumenta a absorção de ferro, com depósitos nos tecidos<sup>2</sup>.

### **7.2 $\beta$ -TALASSEMIA INTERMEDIA**

Crianças apresentam sintomas mais tarde, têm anemia média, raramente necessitando de transfusão. Há risco de desenvolvimento de sobrecarga de ferro secundária a eritropoiese ineficaz.

As principais características clínicas são palidez, icterícia, colelitíase, hepatoesplenomegalia, alterações esqueléticas moderadas a severas, úlceras de membros inferiores, massas extramedulares por hiperplasia eritróide da medula óssea, tendência ao desenvolvimento de osteopenia e osteoporose e alterações trombóticas. A transfusão não é necessária ou é raramente requerida. As complicações associadas a sobrecarga de ferro ocorrem mais tarde, mas podem ser tão severas quanto as apresentadas por pacientes com  $\beta$ -talassemia maior<sup>7</sup>.

### **7.3 $\beta$ -TALASSEMIA MINOR**

Mutação da  $\beta$ -globina em uma cópia do cromossomo 11<sup>5</sup>. Pouca ou nenhuma anemia<sup>7</sup>. Geralmente não requer tratamento clínico<sup>7</sup>.

## 7.4 **COMORBIDADES DA $\beta$ -TALASSEMIA**

### 7.4.1 **PSEUDOXANTOMA ELÁSTICO (PXE)**

O desenvolvimento de manifestações clínicas e histopatológicas de um defeito difuso do tecido elástico semelhante a forma herdada pseudoxantoma elástico (PXE), tem sido encontrado com uma freqüência considerável em pacientes com  $\beta$ -Talassemia<sup>84</sup>.

A síndrome clínica ligada ao PXE consiste de manifestações oculares, epiteliais, vasculares com severidade clínica variável nessa hemoglobinopatia, geralmente dependendo da idade, com o aparecimento mais tarde, depois da segunda década de vida. A grande prevalência do achado implica injúria do tecido elástico como uma das principais anormalidades encontradas na  $\beta$ -Talassemia<sup>84</sup>. A PXE é um raro distúrbio hereditário do tecido conjuntivo, caracterizado por degenerações generalizadas das fibras elásticas com expressão fenotípica ampla.

### 7.4.2 **ATEROGÊNESE**

Há uma considerável incidência de doença eteroesclerótica em pacientes com  $\beta$ -Talassemia<sup>85</sup>. O nível plasmático de MDA nesses pacientes pode representar um índice sensível do estado oxidativo da LDL e seu potencial aterogênico. A aterosclerose é freqüente em pacientes com  $\beta$ -Talassemia intermediária<sup>85, 86, 87</sup> oxidativo é conseqüência da fisiopatologia da  $\beta$ -Talassemia<sup>85, 86, 87, 88, 89</sup>.

## 7.5 **FATORES PROGNÓSTICOS**

A possibilidade de identificar células em foice no sangue de crianças com anemia e sujeitas a severas complicações permite a obtenção do prognóstico e o planejamento de uma terapia, relacionando riscos e benefícios. Dactilite, nível de hemoglobina constantemente menor de 7mg/dl e leucocitose na ausência de infecção, em idade precoce, relacionam-se significativamente com eventos adversos na infância. A perda precoce da função esplênica também é importante para o prognóstico<sup>90</sup>.

Um nível diminuído de hemoglobina está correlacionado com aumento do risco de morte na infância ou idade adulta jovem e infarto. A acelerada diminuição no nível de HbF durante a infância, associada com perda da função esplênica e ocorrência de eventos antes de 1 ano de idade estão fortemente associados com risco de doença severa<sup>90</sup>.



## 9 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de  $\beta$ -talassemia é realizado a partir de dados clínicos, laboratoriais e moleculares <sup>7</sup>. As  $\beta$ -talassemias apresentam três formas de manifestações:  $\beta$ -talassemia minor, geralmente assintomática e, portanto, sendo apenas suspeitada a partir de alterações hematológicas, podendo ser confirmada a partir de avaliação molecular <sup>2,7</sup>;  $\beta$ -talassemia intermédia e major, formas sintomáticas que podem compartilhar características clínicas e laboratoriais, mas não apresentam correlação molecular específica <sup>2,91</sup>.

### 8.1 *DIAGNÓSTICO CLÍNICO*

O diagnóstico clínico é embasado fundamentalmente na severidade da anemia, sendo essa mais intensa na  $\beta$ -talassemia major, manifestando-se normalmente antes dos dois primeiros anos de vida e necessitando de tratamento com transfusões de sangue <sup>2,7</sup>. Os pacientes apresentam geralmente hepatoesplenomegalia e, quando não tratados, déficits do crescimento, hiperplasia da medula óssea com conseqüentes alterações ósseas. Já na  $\beta$ -talassemia intermédia a anemia é mais leve, manifestando-se mais tardiamente e raramente

necessitando de transfusões <sup>2, 7,92</sup>. Embora a  $\beta$ -talassemia *minor* não apresente sintomatologia clínica, tem como característica anemia microcítica leve <sup>7, 92</sup>. Portanto a presença de anemia microcítica de início precoce associada a alterações sanguíneas e aumento de hemoglobina fetal é fortemente sugestivo de  $\beta$ -talassemia major ou intermédia, podendo ser confirmada pela presença do traço  $\beta$ -talassêmico em ambos os pais <sup>2</sup>.

## 8.2 **DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

A investigação laboratorial inicial da  $\beta$ -talassemia inclui hemograma completo, esfregaço de sangue periférico, análise qualitativa e quantitativa da hemoglobina <sup>9</sup>.

### 8.2.1 *TESTES HEMATOLÓGICOS*

#### a) Índices Hematimétricos

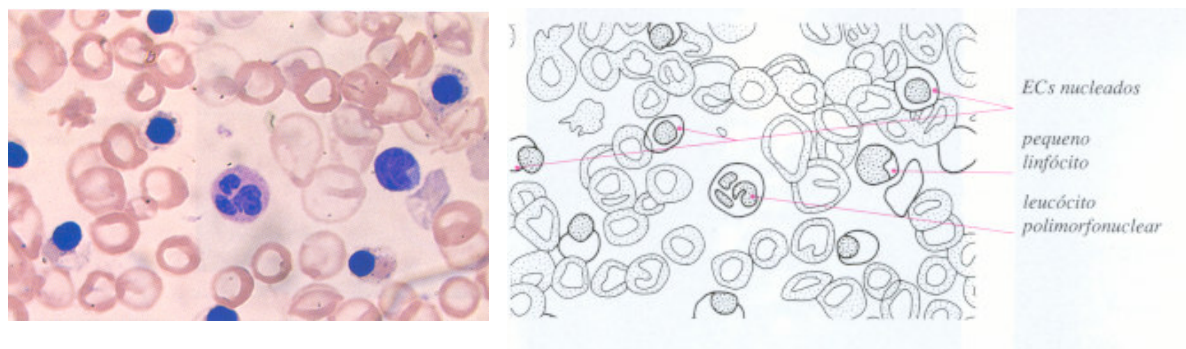
Tanto indivíduos portadores quanto afetados apresentam anemia hipocrômica microcítica com redução dos índices hematimétricos – volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) (Tabela IXV). Entretanto a anemia é mais severa nos afetados <sup>7</sup>.

**Tabela IXV:** Índices Hematimétricos na  $\beta$ -talassemia:

Índices Hematimétricos	Normal (7)		Afetado	Portadores
	Homem	Mulher	$\beta$ -Talassemia major	$\beta$ -Talassemia minor
VCM	82-100 fl	82-100fl	50-70 fl	< 82fl
HCM	27,5-33,2 pg.	27,5-33,2 pg.	12-20 pg.	18-22 pg.
Hemoglobina (Hb)	14-18 g/dl	12-16 g/dl	< 7 g/dl	11-14 g/dl

### b) Esfregaço de Sangue Periférico

Indivíduos afetados apresentam na análise ao microscópio microcitose, hipocromia, anisocitose, e quantidade de eritroblastos (células vermelhas nucleadas) diretamente relacionada ao grau da anemia (Figura 4). Já em portadores há uma alteração na morfologia das células, mais acentuada do que em afetados, sendo incomum eritroblastos <sup>7</sup>.



**Figura 4:** Esfregaço de sangue periférico de paciente com talassemia major. Observa-se anemia hipocrômica microcítica e eritrócitos nucleados.

### c) Análise qualitativa e quantitativa da hemoglobina

Permite identificar a quantidade e os tipos de hemoglobina presentes. Hemoglobina A (HbA), hemoglobina F (HbF) e hemoglobina A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>) são os

principais tipos encontrados na  $\beta$ -talassemia (Tabela XV). Hemoglobina A é predominante em pessoas normais, entretanto, pode estar bastante reduzida, devido diminuição da síntese na  $\beta$ -talassemia intermédia ( $\beta^+$ -talassemia) ou mesmo ausente por inexistência de síntese na  $\beta$ -talassemia major ( $\beta^0$ -talassemia); já na  $\beta$ -talassemia minor os valores estão reduzidos, mas encontram-se próximo ao normal. Contudo a Hemoglobina F que se aproxima de zero após o nascimento, estará aumentada proporcionalmente a diminuição da hemoglobina A.

**Tabela XV:** Amostra de hemoglobina presente conforme o tipo de  $\beta$ -talassemia:

Tipo de Hb	Normal	Afetado		Portador
		$\beta^0$ -talassemia	$\beta^+$ -Talassemia	$\beta$ -Talassemia minor
HbA	96-98%	0	10-30%	92-95%
HbF	< 1%	95-98%	70-90%	0,5-4%
HbA <sub>2</sub>	2-3%	2-5%	< ou > normal	>3-5%

#### d) Análise da Medula Óssea

Normalmente não é necessária para o diagnóstico. Mostra-se extremamente celular com acentuada hiperplasia eritróide e diminuição da razão entre tecido mielóide e eritróide.

### 8.3 **DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

O diagnóstico molecular é feito a partir da análise do DNA com objetivo de

identificar mutações em pontos específicos do gene que codifica a cadeia beta da hemoglobina – HBB, relacionadas ao desenvolvimento da doença e deleções de extensões variáveis dos grupos do gene HBB que resultam em  $\beta$ -talassemia complexa –  $\gamma\delta\beta$ -talassemia e  $\delta\beta$ -talassemia. Os principais usos do diagnóstico molecular são diferenciação entre formas leves e severas de  $\beta$ -talassemia, aconselhamento genético, identificação de mutação em portadores com testes hematológicos sugestivos e diagnóstico pré-natal <sup>7</sup>.

Apesar de existirem mais de 200 tipos de mutações no gene HBB <sup>93, 94</sup>, há um predomínio de cerca de 4 a 10 mutações em cada uma das diferentes populações de risco. A partir desse conhecimento o teste genético torna-se mais fácil, aplicando-se PCR através do uso de probes ou primers complementares as mutações mais freqüentes na população da qual o paciente tem origem.

#### **8.4 DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL**

O diagnóstico pré-natal pode ser realizado a partir do sangue fetal, sendo feita análise e avaliação da síntese de cadeias de globina ou pela análise direta de mutações no DNA, através da extração de células obtidas a partir de amostras de vilosidade coriônica entre a décima e décima segunda semanas de gestação ou amniocentese entre décima quarta e décima oitava semanas. Os métodos de biologia molecular vêm sendo cada vez mais empregados, já que o risco para o feto é muito baixo e a acurácia bastante alta, sendo a análise do DNA feita, principalmente, a partir da técnica da PCR <sup>2, 10, 11</sup>.

O teste pré-natal deve ser indicado quando ambos os pais forem portadores e

a mutação do gene HBB for identificada através da análise do DNA -situação considerada como gravidez de alto risco para desenvolvimento de feto  $\beta$ -talassêmico. Já em gestações consideradas como de risco intermediário o teste é controverso, podendo ser indicado quando um dos pais é heterozigoto confirmado e o outro possui quadro hematológico relacionado à  $\beta$ -talassemia sem confirmação de mutação ou quando a mãe é heterozigota e o pai desconhece ou não foi avaliado, principalmente em populações de risco. Nesses casos a realização do teste deve ser avaliada a partir do aconselhamento genético. E o teste de escolha é a análise de mutação no gene HBB a partir de DNA fetal e se confirmada análise da síntese de cadeias de globina no sangue fetal <sup>7</sup>.

Em alguns países o teste pré-natal é considerado como forma de controle da doença, já que permite a identificação do feto  $\beta$ -talassêmico e possibilitando o abortamento, evitando com isso a incidência de novos casos <sup>2, 94</sup>. A partir disso, pode-se questionar a real utilidade desses testes no Brasil onde o aborto é ilegal e o tratamento pré-natal ainda está distante da nossa realidade, pois se restringe a grandes centros, estando ainda em fase experimental. No entanto, um diagnóstico pré-natal rápido e preciso pode auxiliar a aperfeiçoar os cuidados obstétricos <sup>10</sup>, permitindo que os recém-nascidos recebam atenção e tratamento pós-natal precoce, evitando complicações da doença.

### **8.5 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**

A anemia microcítica leve é uma das principais características da  $\beta$ -talassemia *minor*, sendo comumente encontrada na clínica. Entretanto, essa anemia na maioria das vezes pode ser considerada como devido à deficiência de ferro ou traço

talassêmico. Assim o diagnóstico recai sobre análise da hemoglobina A<sub>2</sub>, quando aumentada sugere  $\beta$ -talassemia menor, se normal requer determinação de ferro sérico ou ferritina que diminuídos indicam anemia por deficiência de ferro ou aumentados  $\alpha$ -talassemia<sup>95</sup>.

Poucas condições apresentam semelhança com a  $\beta$ -talassemia major ou intermédia<sup>7</sup>.

As  $\beta$ -talassemia dominantes ou hemoglobinopatias talassêmicas resultantes de uma anormal hiperinstabilidade da produção de proteínas, são condições raras. Hiperinstabilidade da hemoglobina pode ser suspeitada em pacientes com  $\beta$ -talassemia intermédia quando ambos os pais apresentarem hemograma normal ou em familiares com padrão dominante de transmissão do fenótipo da  $\beta$ -talassemia intermédia. As anemias sideroblásticas são facilmente diferenciadas, devido à presença de sideroblastos em anel (eritroblastos com coroa perinuclear de grânulos contendo ferro) identificados através de distensões de medula óssea pela coloração de Perls<sup>7,83</sup>. Anemias congênitas, devido a ineficaz eritropoiese, normalmente não apresentam aumento de hemoglobina F, sendo essa principal forma de diferenciação com  $\beta$ -talassemia. Entretanto, algumas condições podem apresentar aumento de hemoglobina F como leucemia mielóide crônica e anemia aplásica podendo aparentemente gerar alguma confusão com  $\beta$ -talassemia, mas sendo facilmente diferenciadas a partir de outras características específicas dessas situações<sup>7</sup>.

## 10 TRATAMENTO

A talassemia tem uma ampla gama de formas clínicas, indo desde a talassemia dependente de transfusões na infância, até uma condição leve, que requer pouca ou nenhuma intervenção medicamentosa. A talassemia major é uma forma severa da doença, apresentada por anemia e dependente de transfusões que têm início geralmente no primeiro ano de vida. A talassemia intermédia é a forma menos severa da doença e é muito variável.

Por causa dessa variedade de formas e manifestações, existe entre os pacientes com talassemia intermédia e talassemia maior uma quantidade significativa de sobreposição no uso de diferentes tipos de terapia.

As transfusões e a terapia quelante de ferro são usadas, predominantemente, pelos pacientes com talassemia major. Esse grupo de doentes começa as transfusões no início de suas vidas devido ao depósito de ferro causado pela doença. Um subgrupo desses pacientes pode precisar de terapia quelante de ferro, devido a hiperabsorção desse mineral. Por outro lado, o tratamento de suporte também pode visar ao aumento de produção da hemoglobina fetal com a utilização de, por exemplo, hidroxiuréia e eritropoetina, terapias essas que são quase que exclusivamente aplicadas aos pacientes com talassemia intermédia.



Finalmente, as modalidades curativas são, predominantemente, apropriadas para o tratamento dos pacientes com talassemia major, apesar de algumas dessas técnicas não serem somente caras, mas ainda envolverem alguma mortalidade e morbidade. O grau baixo a moderado de deficiência de muitos dos pacientes com talassemia intermédia geralmente não justifica o uso desse oneroso e arriscado tipo de tratamento. Um pequeno subgrupo de paciente com talassemia intermédia que é mais severamente afetados pode ser considerado candidato para o tratamento curativo, como por exemplo, o transplante de medula óssea. Em muitos casos, o uso de novas formas de tratamento curativo, como a terapia gênica, deverá ser mais amplamente discutido e estudado para seu aperfeiçoamento e posterior uso em seres humanos.

Após essa breve introdução, passemos a cada umas das formas possíveis de terapia da  $\beta$ -talassemia, sejam elas de suporte ou curativas.

## 9.1 ***TRATAMENTO DE SUPORTE***

### 9.1.1 TERAPIA TRANSFUSIONAL

O principal e mais utilizado tratamento de suporte para pacientes anêmicos com  $\beta$ -talassemia é a transfusão sangüínea. Hoje, a maioria dos pacientes com talassemia major recebe transfusões a cada duas ou três semanas, totalizando cerca de vinte e sete litros de sangue por ano<sup>96</sup>.

A terapia transfusional é necessária para munir o paciente com um suprimento temporário de eritrócitos saudáveis e com uma normal capacidade de transportar o

oxigênio necessário para o metabolismo tecidual. O objetivo principal, entretanto, é manter a hemoglobina em níveis ótimos, expondo o paciente ao menor índice de doadores quanto for possível, dando-lhe uma quantidade adequada de sangue.

O nível pré-transfusional de hemoglobina foi, no passado, alvo de grandes controvérsias. Níveis de hemoglobina tão altos quanto 12,0 g/dL eram pregados por alguns meios. Agora é amplamente aceito que o menor índice pré-transfusional de hemoglobina deve ser o entre 9 e 10 g/dL, que é suficiente para suprimir a eritropoiese e permitir um crescimento e desenvolvimento normal<sup>97, 98</sup>.

Recomendações gerais devem ser seguidas pelo médico responsável do paciente talassêmico dependente de terapia transfusional.

Entre essas estão: (a) realização de teste do HIV e de reconhecimento de hepatites virais, teste de funções hepáticas, estudos de DNA para mutações da  $\beta$ -globina e de polimorfismo, e testes para a  $\alpha$ -globina; (b) todas as transfusões devem ser feitas com o leucoporo (usado no momento da coleta); (c) se for detectada aloimunização, o sangue transfundido deve ser fenotipicamente marcado; (d) obtenção pré-transfusional de hemograma completo com leucograma e contagem de reticulócitos, e, após a transfusão, solicitar outro hemograma completo para se verificar se a quantidade de sangue transfundida foi adequada; (e) investigação de todas as suspeitas de reações transfusionais; (f) obtenção dos níveis de ferritina sérica para se avaliar o acúmulo de ferro; (g) fazer uma biópsia hepática anual ou bienal para se analisar os níveis de carga férrica e, (h) realizar uma visita clínica anual a um centro especializado em talassemia<sup>99</sup>.

Além dessas recomendações gerais, nós necessitamos ainda seguir uma série de exigências fundamentais para o início da terapia transfusional em pacientes com

$\beta$ -talassemia: (a) avaliar a hemoglobina antes de cada transfusão e se o valor estiver menor que 9,5 g/dL, considerar se o paciente necessita realizar transfusões mais freqüentes ou um aumento de volume a ser transfundido, pois a hemoglobina média deve ser mantida entre 12 e 12,5 g/dL entre as transfusões; (b) a hemoglobina pós-transfusional deve ser mantida no máximo até 15,5 g/dL; (c) avaliar as exigências transfusionais a cada seis meses baseando-se na média anual de peso do paciente; (d) se for necessária uma quantidade anual superior a 200 cc/kg/ano, a quantidade anual transfundida deve ser revisada para determinar se o indivíduo está sendo transfundido em excesso; (e) verificar o tamanho esplênico a cada visita para verificar a existência de hiperesplenismo; (f) verificar a necessidade de realização de esplenectomia, devendo ficar aqui ressaltado que esse procedimento cirúrgico não garante a diminuição da quantidade de transfusões nesses pacientes; (g) antes da esplenectomia, obter os títulos de IgG pneumocócica e, se negativa, dar a vacina correspondente; (h) após a esplenectomia, todos os pacientes devem ser monitorados para se evitar a trombocitose, tratando aqueles que apresentarem uma quantidade de plaquetas superior a  $1 \times 10^6/\text{mm}^3$  ou maior e, (i) todos os pacientes pós-esplenectomizados devem ser tratados com penicilina para o resto de suas vidas<sup>99</sup>.

Existem estudos, entretanto, que afirmam ser as “supertransfusões” que contêm eritrócitos primários jovens (aquelas que mantêm o hematócrito acima de 35%), efetivas para a diminuição dos níveis do acúmulo de ferro nos pacientes com  $\beta$ -talassemia<sup>100</sup>.

Sangue fresco congelado é tido como o tipo ideal de sangue para ser administrados para pacientes talassêmicos, pois os leucócitos são uma freqüente causa de reação transfusional. Tanto a própria debridação como as citocinas liberadas pelas células brancas podem causar reações transfusionais. Foi,

entretanto, recentemente constatado que os eritrócitos congelados são pobres em 2-3 DPG e, portanto têm baixa capacidade reduzida de transportar o oxigênio <sup>98</sup>.

O método preferido para se diminuir as reações transfusionais é a leucofiltração no momento da coleta. Essa deveria se tornar o procedimento padrão para se coletar sangue em todos os países, o que aumentaria a segurança da transfusão para todas as pessoas que delas dependem.

Muitos agentes virais podem ser transmitidos pela transfusão, incluindo hepatite B, C, HIV, HTLV tipo I e II, e citomegalovírus. As complicações da terapia transfusional para a  $\beta$ -talassemia continuam a ser problemáticas <sup>101</sup> e continuam a ser amplamente estudados.

### 9.1.2 TERAPIA QUELANTE DO FERRO

Atualmente, não resta dúvida de que o uso da quelação do ferro foi um dos mais efetivos avanços terapêuticos no prolongamento da expectativa de vida dos pacientes  $\beta$ -talassêmicos.

O objetivo da terapia quelante é manter a carga total de ferro próximo dos seus níveis normais. O procedimento padrão-ouro para se avaliar a quantidade corpórea total de ferro é a biópsia hepática, podendo também ser clinicamente utilizada a dosagem sérica de ferritina <sup>102</sup>.

Essa forma terapêutica tem sido utilizada em diferentes formas de administração.

A quelação parenteral é a principal forma de terapia em pacientes com talassemia dependentes de transfusões. Para esse fim, a desferrioxamina (Desferal®) tem provado ser de grande utilidade no tratamento da talassemia, revertendo à toxicidade orgânica e prolongando a expectativa de vida quando devidamente utilizada. A droga, no entanto, pode ser irritante quando injetada localmente. Além do mais, muitos estudos têm demonstrado que para realizar uma remoção suficiente de ferro, o paciente precisa usar a droga por infusão contínua subcutânea durante muitas horas por dia, o que totaliza cerca de duzentos e cinquenta dias de tratamento em um ano. Esse rigoroso e, freqüentemente, desconfortável regime de tratamento geralmente tem uma pobre adesão, particularmente durante a adolescência e o início da vida adulta <sup>103</sup>, podendo ser essa, entretanto, aumentada com um intenso serviço social e psicológico <sup>104</sup>. Em um pequeno número de paciente, o tratamento pode não ser facilmente administrado devido a reações alérgicas locais. Após longos anos de monitorização do uso, está agora claro que a desferrioxamina pode ser tóxica quando dada em excesso, podendo ter efeitos neurológicos e afetar o sistema neurosensorial (visão e audição), sendo ainda percebidos efeitos adversos no sistema esquelético, expressados em sua maioria em diminuição da velocidade de crescimento <sup>105</sup>. Por isso, a quelação parenteral precisa ser analisada com cautela, considerando-se a idade de início do tratamento e a dose total a ser administrada. A monitorização inicial de toxicidade é imperativa no princípio e deverá se tornar uma rotina para cada um dos pacientes que a ela for submetido.

Deferiprona (L1) foi o primeiro quelante utilizado por via oral em estudos ao redor do mundo. Inicialmente ela foi usada para a mielodisplasia e, posteriormente, introduzida no tratamento da talassemia <sup>106, 107</sup>. Essa droga é capaz de penetrar na membrana dos eritrócitos, o que é útil terapêuticamente para a remoção do ferro desse local, reduzindo potencialmente o efeito tóxico sobre as membranas dos

talassêmicos <sup>108</sup>. Uma das vantagens da deferiprona é que ela é uma droga substancialmente mais barata de se industrializar do que a deferoxamina e, ainda, a via de administração oral pode aumentar em muito a adesão ao tratamento. Apesar dessas vantagens, a deferiprona é uma droga controversa. Isso se deve a duas razões fundamentais: (a) não se sabe atualmente se a deferiprona é mais eficaz do que a desferrioxamina no que diz respeito à restauração do balanço negativo de ferro nos pacientes  $\beta$ -talassêmicos <sup>109, 110, 111</sup>; (b) a deferiprona parece ser uma droga mais tóxica do que a desferrioxamina, já tendo sido reportados casos de agranulocitose, neutropenia (inclusive com a ocorrência de uma morte) e fibrose hepática <sup>111, 112, 113, 114</sup>. As controvérsias citadas acima foram um dos campos de maiores debates e discussões na especialidade de hematologia nos últimos tempos. Apesar de tudo isso, a comercialização da deferiprona foi liberada recentemente pela Vigilância Sanitária Brasileira. Assim, só nos resta esperar pacientemente os resultados de novos estudos sobre a terapia oral com deferiprona, para que possamos avaliar melhor seus efeitos adversos e sua real eficácia quando comparada com a terapia parenteral; enquanto isso, esse esquema terapêutico deve ser usado com prudência.

Outra opção no tratamento dos pacientes  $\beta$ -talassêmicos é a combinação de agentes quelantes do ferro, que parece ter um maior sucesso do que o uso de uma única droga <sup>115, 116</sup>. Parece lógico que a administração de pequenas doses de muito agentes quelantes deve ser menos tóxica do que o uso de um único medicamento em uma dose elevada. Além do mais, dados preliminares mostram que as drogas quando combinadas parecem ter uma ação sinérgica <sup>113, 114</sup>.

Atualmente, centenas de drogas têm sido testadas, entretanto, raras têm demonstrado potencial para serem utilizadas como quelantes. Em grande parte dos casos, isso se deve à toxicidade. Uma dessas novas drogas, a HBED (uma amina

polianiónica), foi recentemente relatada por Bergeron e colaboradores como tendo potencial terapêutico <sup>117</sup>, sendo inclusive mais eficaz do que a desferrioxamina <sup>118, 119</sup>.

### 9.1.3 AUMENTO DA SÍNTESE DE HEMOGLOBINA FETAL

Apesar de ainda ser uma terapia experimental para os pacientes com  $\beta$  talassemia, um aumento na síntese da hemoglobina fetal (HbF;  $\alpha_2\gamma_2$ ), tem sido amplamente avaliada por causa de uma de suas propriedades que é a de ser a substituta fisiológica para a hemoglobina do adulto normal (HbA;  $\alpha_2\beta_2$ ) nos eritrócitos de pacientes com  $\beta$  talassemia.

Essa possibilidade terapêutica tem se mostrado muito útil no alívio dos sintomas dos pacientes portadores da doença <sup>120</sup>, podendo ser feita através do uso de uma série de diferentes medicações.

#### 9.1.3.1 5-AZACITIDINA

Inicialmente foi testada a administração de 5-azacitidina, que, experimentalmente usada se mostrou capaz de ativar os genes reprimidos em células de tecidos de cultura e de aumentar a produção de hemoglobina fetal em babuínos flebotomizados <sup>121</sup>.

A 5-azacitidina, uma análoga da citidina, intravenosamente usada por um

período de sete dias em pacientes desbalanceados, mostrou um aumento na síntese de gamaglobinas, na efetividade da eritropoiese (aumento da contagem de reticulócitos em cerca de quatro vezes) e também da concentração de hemoglobina. Esses achados se deveram a uma elevação de RNAm de globinas na medula óssea, diminuindo a metilação do promotor do gene da globina e, aumentando reticulócitos F e o nível de hemoglobina e da concentração de HbF <sup>122, 123, 124</sup>. Os pesquisadores, entretanto, ainda esperavam maiores informações sobre os efeitos farmacodinâmicos da droga <sup>125</sup>.

Verificou-se, posteriormente, que essa medicação tinha um alto potencial tóxico e, assim, foi deixada parcialmente de lado e se começou buscar novas opções com menor toxicidade. Um análogo da própria 5-azacitidina, a 2-dióxi-5-azacitidina, mostrou, através de um ensaio clínico preliminar, um aumento relativamente significativo da HbF em pacientes que não responderam à terapia com hidroxiuréia, mas também apresentou como efeito adverso uma neutropenia leve e reverssível <sup>126</sup>.

Atualmente, essas drogas estão restritas ao uso experimental.

#### 9.1.3.2 HIDROXIURÉIA

A hidroxiuréia tem sido usada no tratamento da anemia falciforme com o objetivo de elevar os níveis de hemoglobina, reduzir as complicações clínicas da doença, diminuir a dor e o tempo de hospitalização e elevar, com isso, a qualidade de vida nesses pacientes <sup>127</sup>. Em alguns indivíduos com anemia falciforme, os níveis de HbF foram significativamente elevados pela terapia com essa medicação, sendo,



portanto, um passo lógico para o uso da droga nos portadores de  $\beta$ -talassemia.

O objetivo do uso da hidroxiuréia seria reduzir a síntese desbalanceada da cadeia da globina pelo aumento da síntese da cadeia não  $\alpha$  da globina. O seu potencial uso nas síndromes talassêmicas, entretanto, é questionável <sup>128</sup>, sendo os resultados dos primeiros estudos, realizados com pacientes dependentes de transfusões, desapontadores <sup>129</sup>.

Relatos de casos posteriores, no entanto, mostraram um aumento importante dos parâmetros hematológicos de pacientes com talassemia intermédia que receberam hidroxiuréia. Esse fato se deve, principalmente, ao maior incremento da HbA do que da HbF <sup>130</sup>.

Outras pesquisas, apesar de mostrarem uma elevação dos valores da HbF, indicaram que o aumento dos níveis de hemoglobina total em pacientes com talassemia intermédia tem sido menor, ou em muitos casos inconsistente, tendo um estudo detectado que a escalação da dose não resultava em benefícios crescentes <sup>131, 132</sup>. De fato, em pacientes com  $\beta$ -talassemia intermédia, a resposta hematológica a hidroxiuréia, sozinha ou em associação com eritropoetina humana, é controversa <sup>129, 130, 131</sup>. Pouco se sabe sobre a efetividade da terapia em longo prazo.

O constatado foi que poucos pacientes com talassemia intermédia ou mais raramente pacientes com talassemia major, podem responder drasticamente a hidroxiuréia com a diminuição da necessidade de transfusões <sup>132, 135</sup>.

Estudos clínicos cuidadosamente elaborados são necessários para se determinar à dose, para se desenvolver parâmetros que possam ajudar a prever quem irá responder, e mais importante ainda, para se determinar se existem efeitos

tóxicos em longo prazo nos pacientes com  $\beta$ -talassemia <sup>136</sup>. Enquanto isso, a terapêutica ideal para os pacientes  $\beta$ -talassêmicos continua a ser as transfusões sanguíneas regulares e o uso de quelantes do ferro.

#### 9.1.3.3 DERIVADOS DO BUTIRATO (ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA)

O butirato e seus derivados têm sido testados como método terapêutico para aumentar a síntese da hemoglobina fetal desde que Perrine e colaboradores <sup>137</sup> observaram que crianças de mães diabéticas adiavam a mudança da hemoglobina fetal, e que essas, ainda, apresentavam uma concentração aumentada de ácido butírico em seus plasmas. Mais tarde, o próprio Perrine infundiu, através de cateterização, butirato em fetos de cordeiro, o que provocou um retardo na expressão do gene da globina <sup>138</sup>.

O butirato de sódio aumentou a hemoglobina fetal em babuínos e também a expressão do gene da  $\gamma$ -globina nos eritrócitos de pacientes com  $\beta$ -talassemia e com anemia falciforme <sup>139, 140</sup>, mas os ensaios clínicos iniciais de  $\beta$ -talassêmicos que usaram infusão contínua da droga durante 2 e 3 semanas foram inconclusivos <sup>141, 142, 143, 144</sup>.

O primeiro agente testado foi o butirato de arginina que se mostrou efetivo em alguns pacientes quando administrado tanto por infusão intravenosa contínua quanto por terapia de pulso intravenoso <sup>145</sup>, sendo posteriormente desenvolvida a terapia oral.

Todos os ácidos graxos de cadeia curta têm muitos problemas de

administração. Um deles é a necessidade de se administrar uma grande quantidade de droga (podendo chegar à cerca de 60 pílulas por dia), com importantes efeitos adversos <sup>146</sup>.

Alguns estudos têm demonstrado que 40-50% dos pacientes terão um aumento de uma grama ou mais nos níveis de hemoglobina com o uso do isobutirato de sódio e do fenilbutirato de sódio <sup>147</sup>, apesar de ensaios clínicos recentes demonstrarem que em seis crianças o isobutirato de sódio não provocou efeito terapêutico <sup>148</sup>.

Atualmente, apesar de novos derivados desses componentes estarem sendo desenvolvidos com o intuito de se tentar maximizar seus benefícios terapêuticos, o uso do butirato e de seus análogos na  $\beta$ -talassemia continua experimental e não pode ser recomendado fora de estudos clínicos.

#### 9.1.3.4 ERITROPOETINA

A administração de largas doses de eritropoetina mostrou ser capaz de aumentar a produção de hemoglobina fetal em babuínos <sup>149</sup>. A partir desse dado inicial, foi desenvolvida uma série de ensaios clínicos que tentaram associar o uso de eritropoetina a um aumento nos níveis de hemoglobina fetal em humanos.

Alguns desses estudos conseguiram, de certa forma, fazer achados significativos. Rachmilewitz e colaboradores <sup>150</sup> demonstraram que ocorreu uma aceleração no crescimento linear em crianças  $\beta$ -talassêmicas que faziam uso da medicação, além de indicarem a existência de um fenômeno ainda pouco compreendido que faz com que nem todos os pacientes respondam de forma

benéfica à terapia com a eritropoetina humana.

Algumas fontes ainda relatam que o uso dessa medicação em pacientes esplenectomizados propiciaria uma melhor resposta, enquanto outros estudos divergem sobre essa questão, sugerindo a existência de outros fatores para tal achado <sup>151</sup>.

Deve-se levar em conta também, que a questão chave para o uso da eritropoetina é a necessidade de uma suplementação com ferro, principalmente em pacientes com insuficiência renal <sup>152</sup>.

O uso da eritropoetina humana, portanto, pode ser um valioso adjunto para alguns pacientes com talassemia intermédia, apesar do alto custo da medicação e de sua apresentação parenteral limitarem bastante o tratamento.

#### 9.1.3.5 HEMINA

*In vitro*, a hemina tem um profundo efeito sobre a maturação celular e promove a síntese da hemoglobina fetal em progenitores eritrocitários.

Existem, atualmente, poucos estudos a respeito da droga, mas os que foram encontrados, indicam que ela realmente possui potencial clínico <sup>153</sup>, apesar de a flebite no local da aplicação ser um problema relativamente preocupante nos pacientes com  $\beta$ -talassemia, que têm um acesso venoso bastante limitado.

Esse mesmo estudo demonstrou que os níveis de hemoglobina fetal não

modificaram significativamente em nenhum dos pacientes participantes do estudo, apesar das culturas *in vitro* de células progenitoras eritrocíticas dos pacientes demonstrarem uma drástica elevação na produção de hemoglobina fetal quando foi acrescentada hemina ao meio.

Pesquisas futuras poderão utilizar doses mais freqüentes ou administrar hemina semanalmente em combinação com outros agentes que estimulem a hematopoiese e a produção de hemoglobina fetal.

#### 9.1.3.6 COMBINAÇÕES TERAPÊUTICAS

Diante de tantos resultados animadores propiciados pelos agentes que estimulam a produção da hemoglobina fetal ou produção da hemoglobina total, é lógico que estudos clínicos deveriam surgir para se avaliar a combinação desses fármacos.

Estudos iniciais combinavam a administração de hidroxiuréia com a eritropoetina na  $\beta$ -talassemia, combinação essa que parecia bastante conveniente, já que a eritropoetina induzia a produção de mais eritrócitos enquanto que a hidroxiuréia induzia a produção de glóbulos vermelhos de “melhor qualidade”. De fato, esse esquema terapêutico se mostrou benéfico aos pacientes com anemia falciforme<sup>154, 155</sup>, sendo que estudos envolvendo pacientes com  $\beta$ -talassemia ainda estão em desenvolvimento.

A terapia combinada parece ser a ideal, visto que o potencial sinergismo entre as drogas provém de diferentes mecanismos, além de terem os efeitos adversos

antagônicos, isso é, enquanto a eritropoetina estimula a medula óssea, a hidroxiuréia a suprime. Esse esquema representa uma esperança de redução da necessidade de transfusões e de aumento da qualidade de vida para os pacientes  $\beta$ -talassêmicos.

A terapia combinada, entretanto, precisa ainda passar por uma série de estudos para que sejam definidos elementos farmacocinéticos e farmacodinâmicos próprios da associação.

#### 9.1.4 ANTIOXIDANTES

Os radicais livres de oxigênio estão possivelmente envolvidos na fisiopatologia da talassemia. A liberação de pequenas quantidades de ferro livre de cadeias  $\alpha$  desparelhas nos eritrócitos de  $\beta$ -talassêmicos pode iniciar uma auto-amplificação de reações redox que depletam simultaneamente o potencial de redução celular, oxidando a hemoglobina adicional e acelerando a destruição das células vermelhas<sup>156</sup>. É sabido que a destruição dos eritrócitos na medula óssea de paciente com talassemia, que em parte se deve a um processo apoptótico aumentado dos precursores eritróides, está relacionada com o dano membranoso.

Muitas substâncias naturais, como a vitamina P (um flavanóide)<sup>157</sup> e os polifenóis (encontrados no chá verde e preto)<sup>158</sup>, possuem propriedades antioxidantes. Essas substâncias se mostraram eficazes nos estudos realizados *in vitro*, além de terem uma baixa toxicidade.

Estudos a respeito dessas substâncias estão em desenvolvimento e poderão,

quem sabe, provar de fato a sua utilidade para limitar as complicações da  $\beta$ -talassemia.

## **9.2 TERAPIA CURATIVA**

### **9.2.1 TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA**

O transplante de medula óssea é, ao lado da terapia gênica, uma das formas de terapia curativa da  $\beta$ -talassemia. O que, fundamentalmente as diferencia, é o fato de o transplante de medula óssea, realizado das formas mais diversas, já ser uma técnica bem consolidada, enquanto a terapia gênica é uma área que acaba de começar a engatinhar no que diz respeito a sua parte prática.

O transplante de medula óssea realizado de forma convencional é feito desde o ano de 1982<sup>159</sup> e, a partir de então, mais de mil já foram realizados em todo o mundo. A decisão de se realizar o transplante de medula óssea alogênico é considerada apropriada somente naqueles pacientes que têm um doador totalmente compatível no sistema HLA, o que totaliza apenas 30 a 40% dos  $\beta$ -talassêmicos. Ele ainda envolve uma série de questões éticas que vão desde a duração da terapêutica, até as condições de vida que o paciente transplantado terá, comparando se essa será realmente superior a dos pacientes que fizerem uso da terapia convencional, já que o tempo de vida dos pacientes  $\beta$ -talassêmicos tem aumentado drasticamente com a realização de um bom tratamento de suporte<sup>160</sup>.

Dados mostram que a incidência de hipotireoidismo, hipogonadismo e cardiopatia têm sido mais elevada nos pacientes tratada convencionalmente, enquanto que a sepse fulminante e os déficits de crescimento <sup>161</sup> são mais incidentes no grupo de pacientes transplantados. Os déficits de crescimento podem ser tratados com sucesso em alguns casos, mas não em todos, com o uso de hormônio do crescimento recombinante <sup>162, 163</sup>. Não houve diferença de incidência de diabetes, doenças hepáticas e infecções severas nesses dois grupos de doentes <sup>164</sup>.

Alguns pacientes, mesmo após o transplante de medula óssea, precisam continuar a receber uma dose reduzida de desferrioxamina <sup>165</sup>. Os transplantes de medula óssea oferecem a resolução de muitos dos problemas da  $\beta$ -talassemia, sendo que os benefícios que serão atingidos devem ser contra-balanceados, no momento da escolha dessa intervenção terapêutica, com os pequenos riscos cirúrgicos e pós-operatórios. O centro de transplante de medula óssea de Pesaro, Itália, é um dos que mais realizam essa terapêutica no mundo, sendo que os resultados lá obtidos são bastante favoráveis: sobrevida superior a 93% em nove anos <sup>166</sup>.

Pesquisadores desse mesmo centro <sup>167</sup> formularam um esquema para classificarmos os fatores de risco envolvidos na realização do transplante. Esse leva em conta a presença de hepatomegalia, fibrose em biópsia de fígado e a história de não-adesão ao tratamento quelante de ferro, sendo os pacientes classificados em classe I, II e III.

O transplante de medula óssea em pacientes mais idosos é uma opção racional em casos onde é observada uma deteriorização com o uso de terapia convencional. Desse modo, o transplante de medula óssea convencional é uma opção racional para adultos com doença talassêmica progressiva e que possuem



doadores compatíveis <sup>168</sup>, mesmo aqueles pertencentes à classe III <sup>169</sup>.

Outra forma de transplante é aquele realizado com a utilização de sangue proveniente do cordão umbilical. Essa técnica, realizada pela primeira vez em 1995<sup>170</sup>, tem sido considerada uma fonte para o transplante de células tronco hematopoiéticas. O sangue do cordão umbilical de crianças pertencentes a famílias que possuem uma incidência elevada da doença pode ser criopreservado para a futura doação celular. Um dos grupos de grande experiência nessa forma de tratamento é o Eurocord, que tem obtido resultados expressivos no tratamento de crianças  $\beta$ -talassêmicas utilizando essa forma de procedimento <sup>171</sup>. Um estudo realizado em 2001 considerou esse procedimento seguro e eficaz no tratamento de crianças com  $\beta$ -talassemia <sup>172</sup>. A escolha e as chances preditivas de doadores de células tronco nesses casos foram recentemente revisadas <sup>173</sup>. No futuro, se a tecnologia para a expansão das células tronco se tornar disponível, um número suficiente de células tronco poderão ser produzidas a partir de um pequeno número de células sangüíneas do cordão umbilical, o que tornaria o transplante de células precursoras hematopoiéticas provenientes do cordão umbilical uma realidade para muito mais pacientes.

Um número ainda pequeno de centros começou a realizar o transplante de medula óssea intra-uterino. Como fonte de células precursoras da hematopoiese, estão sendo utilizados fígado fetal e células-tronco derivadas da medula óssea <sup>174</sup>. No início, houve um elevado número de mortes fetais, mas aperfeiçoamentos das técnicas obstétricos subseqüentes têm permitido uma melhora no pós-operatório<sup>175</sup>. Atualmente, transplantes intrauterinos com sucesso têm sido relatados apenas em síndromes de imunodeficiência congênitas <sup>176</sup>, não tendo ainda tido resultados significativos para a  $\beta$ -talassemia <sup>177, 178</sup>. O conceito da administração de células-tronco exógenas está baseado no fato de que o feto está desprovido de medula

óssea até a vigésima segunda semana e, portanto, está ontogenicamente preparado para receber células-tronco que cheguem do sangue periférico. O uso de células doadas por um adulto é problemático devido ao volume celular que necessita ser extremamente reduzido e enriquecido com células-tronco. É preciso também que exista um nicho onde as células do doador possam ser enxertadas e para que, assim, elas possam adquirir uma vantagem sobre as células-tronco hematopoiéticas do receptor. Todas essas considerações ressaltam a natureza problemática do transplante de medula óssea intrauterino em pacientes com  $\beta$ -talassemia, apesar do relato de melhoras recentes nas técnicas do procedimento.

### 9.2.2 TERAPIA GÊNICA

Desde que se descobriu que a  $\beta$ -talassemia é causada pela redução ou ausência de função de um único gene, ela foi uma das primeiras doenças a ser considerada tratável por meio de terapia gênica. Essa expectativa foi sustentada por experimentos exitosos na transferência do gene da  $\beta$ -hemoglobina em modelos experimentais (ratos) a cerca de 15 anos atrás<sup>179</sup>. No entanto, o objetivo principal da terapia gênica utilizando os genes da  $\beta$ -globina tem provado ser excessivamente difícil de ser atingido devido a uma série de fatores<sup>180</sup>, com, por exemplo, os altos níveis exigidos durante um tempo específico do desenvolvimento e a natureza alusiva das células-tronco hematopoiéticas humanas, que são as células alvo para a entrega do gene da  $\beta$ -globina.

Três estratégias gerais têm sido consideradas como metodologia para se executar a terapêutica gênica da  $\beta$ -talassemia. A primeira é a transferência gênica, ou seja, a adição de um gene exógeno às células humanas hematopoiéticas. De

longe, o método mais comumente utilizado para se atingir esse objetivo tem sido a transferência gênica mediante um vírus, que pode ser tanto um retrovírus quanto adenovírus associados (AAV). Descobertas que afetam a transferência gênica às células-tronco hematopoiéticas humanas incluem a observação de que essas células expressam baixos níveis do receptor anfotrópico viral, que limita a capacidade de infectá-las<sup>181</sup>. Melhoras na transferência retroviral foram tentadas com a utilização de um vetor viral carregador de um gene para esse receptor<sup>182</sup>. Alguns laboratórios se concentram no desenvolvimento de estruturas virais altamente complexas, incluindo um grande número de elementos. Os AAVs têm sido utilizados com outros propósitos, já que eles não contêm elementos promotores virais, e, portanto, eliminam a possibilidade de interferência transcricional como a causa de problemas de expressão. No entanto, eles requerem títulos extremamente altos.

Novas famílias de vetores retrovirais estão sendo desenvolvidas. Elas incluem os lentivírus e os espumavírus. A vantagem desses vetores sobre os vetores retrovirais tradicionais é que eles parecem ter uma necessidade reduzida de divisão celular para levar adiante uma infecção. A necessidade de divisão celular tem sido um sério problema à transferência gênica para células-tronco hematopoiéticas, uma vez que a manipulação até a exposição a múltiplas citocinas são necessária para a entrada do retrovírus. Essa exposição não foi somente onerosa, mas também pareceu empurrar as células-tronco para a diferenciação, e, portanto, as células-tronco verdadeiras não eram traduzidas<sup>183</sup>. Futuros experimentos irão demonstrar se os novos vetores virais darão uma vantagem para superar esses fundamentais problemas.

Um vetor viral alternativo que tem sido usado com sucesso para a transferência do gene da  $\beta$ -globina é o SV40. Esse pequeno vírus com dupla hélice de DNA pode sofrer engenharia genética para carregar o mínimo de seqüências virais, podendo

sem o estímulo de citocinas para infectar os eritrócitos humanos <sup>184</sup>. Avanços técnicos no desenvolvimento do vetor incluem o empacotamento *in vitro* de partículas do SV40 que não requerem a presença de qualquer seqüência de DNA do vírus. Outras estratégias incluem a adição de seqüências da  $\beta$ -globina. Essas melhorias e as vantagens seguras básicas tornam o SV40 um vetor de relevante importância para a terapia genética de desordens da globina.

A segunda variante estratégica de terapia genética da  $\beta$ -talassemia é o uso de várias artimanhas de biologia molecular para a correção do DNA e, assim também, da mutação, corrigindo o RNA mutante que seria transcrito. Uma dessas estratégias explora o próprio mecanismo de reparo celular através da introdução de alvos oligonucleotídicos em regiões específicas da dupla fita de DNA que contém a mutação <sup>185</sup>. Métodos prévios usando a recombinação homóloga pela introdução de uma grande quantidade de material genético (plasmídios) também têm sido aplicados, mas não têm apresentado sucessos por causa da baixa freqüência dos alvos. Métodos de introdução de riboenzimas com o propósito de correção do RNA viral têm sido matéria de muitos experimentos. Oligodeoxinucleotídeos reversos podem também ser usados para esse propósito <sup>186</sup>.

Esses métodos são limitados pelos limites gerais da tecnologia de transferência gênica e pelas necessidades de altos índices de expressão. As vantagens desses sistemas é que eles não precisam ser tecido-específicos, já que o RNA anormal existe somente no precursor eritróide em desenvolvimento.

Uma terceira estratégia para a terapia gênica da talassemia envolve o uso de métodos para diminuir a regulação do gene da produção das cadeias  $\alpha$ -globinas, reduzindo, assim, o desbalanço entre as cadeias. Esse método pode ser o mais útil para o tratamento da talassemia intermédia em que há a suficiente expressão do

gene produtor das cadeias  $\beta$  da globina.

No ano passado, May e colaboradores descobriram que um lentivírus contendo o gene da  $\beta$ -globina e seqüências de regiões controladoras de locus (LCR) poderia ser eficientemente transferido para o interior de células-tronco hematopoiéticas de ratos com  $\beta$ -talassemia minor. Nessas células, os RNA mensageiros da  $\beta$ -globina humana estavam presentes em níveis de 13% de  $\beta$ -globina endógenas por cópia do vetor, e o nível das células vermelhas foi significativamente aumentado. Esse foi um importante avanço, pois mostrou que o lentivírus poderia superar a instabilidade dos vetores retrovirais da globina e que altos níveis de expressão de genes da globina poderiam ser alcançados. Trabalhos recentes no Instituto de Tecnologia de Massachusetts e na Universidade de Washington confirmaram as evidências sobre o lentivírus. Esses resultados são somente o começo. Muitos pesquisadores têm descoberto que a expressão transgênica do vetor viral pode ser silenciada por mais tempo. Não está totalmente claro se as conseqüências secundárias da talassemia poderiam ser corrigida pelo aumento de quantidade de expressão da  $\beta$ -globina humana.

Apesar de tudo isso, ainda não se sabe se a terapia gênica poderá ser capaz de curar todas as formas de talassemia e se os vetores lentivírus baseados no HIV são clinicamente seguros. Os resultados preliminares são promissores, mas novos estudos são necessários para que questionamentos básicos sobre a segurança, a efetividade e a forma mais apropriada de realização do processo sejam respondidas em sua plenitude.

## 10 ACONSELHAMENTO GENÉTICO

O aconselhamento genético é um processo que mantém os indivíduos afetados por uma doença genética e suas famílias informados sobre a natureza da herança e as implicações genéticas, ajudando-os a tomar decisões pessoais <sup>7</sup>. O aconselhamento genético também fornece apoio a famílias, casais ou indivíduos que sofreram o impacto de doenças genéticas <sup>187</sup>. Existem grupos de apoio a portadores de doenças genéticas, como  $\beta$ -Talassemia. Os conselheiros, pessoas que trabalham nesses grupos, podem auxiliar decisões pessoais, como testes diagnósticos, cuidados com a saúde, reprodução dos indivíduos afetados.

Riscos para membros da família de um indivíduo afetado: Os pais de uma criança afetada são obrigatoriamente heterozigotos e, portanto, carreadores de uma única cópia do gene causador da mutação HBB <sup>7</sup>. Os heterozigotos são clinicamente assintomáticos e infreqüentemente apresentam uma leve anemia <sup>7</sup>. Em cada gestação, o casal em que ambos são heterozigotos tem 25% de chance de produzir 1 criança afetada, 50% de gerar um carreador e 25% de não gerar carreador ou afetado.

Para o máximo de benefício do aconselhamento genético, heterozigotos devem ser identificados antes de gerar uma criança doente <sup>188</sup>. Depois de identificados, devem ser informados do risco de gerar uma criança afetada <sup>188</sup>. Os

filhos de um indivíduo afetado e de um não afetado herdam uma cópia do gene causador da doença, HHB, do progenitor afetado, sendo, portanto heterozigoto obrigatório<sup>7</sup>.

## 11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LORENZI TF: Manual de Hematologia – Propedeutica e Clinica. Medsi, Rio de Janeiro, 1992.
2. OLIVIERI NF: The  $\beta$ -Thalasseмии. New Eng J Med 341:99-109, 1999.
3. WEATHERALL DJ: The Thalasseмии. In: Beutner E; Lichtman MA; Collier BS; Kipps TJ. (eds) Williams Hematology. 5<sup>th</sup> ed. New York, McGraw-Hill. 1995.
4. THOMPSON MW, McINNES RR, WILLARD HF (eds): Thompson & Thompson Genética Médica, 5<sup>a</sup> edição, 1991.
5. JORDE LB, CAREY JC, BAMSHAD MJ, RAYNALD LW (eds): Genética Médica, 2<sup>a</sup> edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.
6. WHIPPLE GH, BRADFORD WL. Mediterranean disease: thalassemia erythroblastic (anemia of Cooley): associated pigment abnormalities simulating hemochromatosis. J Pediatr 9:279-311, 1936 [abstract].
7. CAO A, GALNELLO R: Beta-thalasseμία. Disponível em [www.geneclinics.com](http://www.geneclinics.com)
8. LORENZI FT (ed). Manual de Hematologia, Propedêutica e Clínica. Medsi Editora Médica e Científica, 252-262, 1992.
9. BERENDT HF, BLAKNEY GB, CLARKE GM, HIGGINS TN: A case of  $\beta$  Thalasseμία Major Detected Using HPLC in Child of Chinese Ancestry. Clinical Biochemistry 33(4):311-313, 2000.
10. CHERN RS, CHEN CP: Molecular prenatal diagnosis of thalasseμία in Taiwan. International Journal of Gynecology & Obstetrics 69:103-106, 2000.
11. CHANG JG, LIU HJ. Molecular Diagnosis of thalasseμία in Taiwan. Kaohsiung J Med Sci 11:371-378, 1995.
12. WEATHERALL DJ: The thalasseмии. In: Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PH, Van Muiswiler J (eds). The molecular basis of blood diseases. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994.
13. WEATHERALL DJ. Common genetic disorders of the red cell and the “malaria hypothesis”. Ann Trop Med Parasitol 81:539-48, 1987 [abstract].



14. BERNARD J, LEVY JP, VALET B, CLAVEL JP, ROIN JD, SULTAN Y (eds): Hematologia, 9ª edição. Rio de Janeiro, MEDSI Editora Médica e Científica Ltda, 2000.
15. BRAUNWALD E et al (eds): Harrison's Principles of Internal Medicine, 15ª edição. Nova Iorque, McGraw Hill, 2001.
16. MARKS DM, MARKS AD, SMITH CM (eds): Basic Medical Biochemistry, 1ª edição. Nova Iorque, Lippincott Williams & Wilkins, 1995.
17. LEHNINGER AL, NELSON DL, COX MM (eds): Princípios de Bioquímica, 2ª edição. São Paulo, Editora Sarvier, 1995.
18. GAY JC, PHILLIPS JA, KAZAZIAN HH: Hemoglobinopathies and Thalassemias. In: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE (eds). Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics, Volum 2, Third edition, New York, 1997.
19. WEATHERALL DJ, PROVAN AB: Red cells I: inherited anaemias. Lancet 355:1169-75, 2000.
20. GROSVELD F, DILLON N, HIGGS D: The regulation of human globin gene expression. Clin Haematology 6:31-55, 1993.
21. WEATHERALL DJ: Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias, Nature Reviews Genetics 2,245-255, 2001.
22. LEE GOLDMAN, J. CLAUDE BENNETT (eds): Cecil Tratado de Medicina Interna, 21ª edição. São Paulo, Guanabara Koogan, 2001.
23. COTRAN SR, KUMAR V, COLLINS T (eds): Robbins: Patologia Estrutural e Funcional, 6ª edição. São Paulo, Guanabara Koogan, 2000.
24. MA SK et al: Clinical phenotype of triplicated alpha-globin genes and heterozygosity for beta0-thalassemia in Chinese subjects. Int. J. Mol. Med 8(2):171-5, 2001.
25. MURRU S et al: Molecular characterization of beta-thalassemia intermedia in patients of Italian descent and identification of three novel beta-thalassemia mutations, Blood 77(6):1342-1347, 1991.
26. BADENS CA, THURET IB, LENA-RUSSO D: Les Syndromes Thalassemiques. Revue Française des Laboratoires 324:23-27, 2000,
27. DOWER A et al: Genetic factors affecting clinical severity in beta-thalassemia syndromes, J Pediatr Hematol Oncol;22(6):573-80, 2000.
28. PETER L et al: Major Hematologic Diseases in the Developing World - New Aspects of Diagnosis and Management of Thalassemia, Malaria Anemia, and Acute Leukemia. Blood 2001
29. GELEHRTER TD, COLLINS FS, GINSBURG D: Molecular Genetics of Human Disease: Hemoglobinopathies. In: Gelehrter TD, Collins FS, Ginsburg D. (eds). Principles of Medical Genetics. 2<sup>nd</sup> ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1998.
30. NUSSBAUM RL, McINNES RR, WILLARD HF: Principles of molecular disease:

- Lesson from the Hemoglobinopathies. In: NUSSBAUM RL; McINNES RR; WILLARD HF (eds). Thompson & Thompson Genetics in Medicine. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2001.
31. MULLER RF, YOUNG ID: Haemoglobin and the haemoglobinopathies. In: Muller RF, Young ID (eds). Emery's Elements of Medical Genetics 10<sup>th</sup> ed. London. Churchill Livingstone, 1998.
  32. HUISMAN HJ, CARVER MFH, BAYSAL E (ed): Syllabus of Thalassemia Mutations. Atlanta, The Sickle Cell Anemia Foundation 1997.
  33. SHAJI RV, GERARD N, KRISHNAMOORTHY R, SRIVASTAVA A, CHANDY M: A novel beta-thalassemia mutation in an Asian Indian. Hemoglobin 26(1):49-57, 2002 [abstract].
  34. NADKARNI A et al: A novel beta<sup>0</sup>-thalassemia mutation at codon 55 (-A) and a rare 17 bp deletion at codons 126-131 in the Indian population. Hemoglobin 26(1):41-7, 2002 [abstract].
  35. NOPPARATANA C, SAECHAN V, NOPPARATANA C, PORNPATKUL M, PANICH V, FUKUMAKI Y: A novel 105 basepair deletion causing beta<sup>0</sup>-thalassemia in members of a Thai family. Am J Hematol 61(1):1-4, 1999 [abstract].
  36. MIYAZAKI A et al: Compound heterozygosity for beta<sup>(+)</sup>-thalassemia [-31 (A-->G)] and a new variant with low oxygen affinity, Hb Sagami [beta139(H17)Asn-->Thr]. Hemoglobin 23(3):267-71, 1999 [abstract].
  37. SADIQ MF, EIGEL A, HORST J: Spectrum of beta-thalassemia in Jordan: identification of two novel mutations. Am J Hematol 68(1):16-22, 2001 [abstract].
  38. BADENS C, JASSIM N, MARTINI N, MATTEI JF, ELION J, LENA-RUSSO D: Characterization of a new polymorphism, IVS-I-108 (T-->C), and a new beta-thalassemia mutation, -27 (A-->T), discovered in the course of a prenatal diagnosis. Hemoglobin 23(4):339-44, 1999 [abstract].
  39. MA SK, HA SY, CHAN AY, CHAN GC, LAU YL, CHAN LC: Two novel beta-thalassemia alleles in the Chinese: the IVS-II-2 (-T) and nucleotide +8 (C-->T) beta-globin gene mutations. Hemoglobin 24(4):327-32, 2000 [abstract].
  40. WAYE JS, ENG B, PATTERSON M, CHUI D, FERNANDES BJ: Novel Beta-thalassemia Mutation in Patientes of Jewish Descent: [beta 30(B12)Arg-->Gly or IVS-I(-2)(A-->G)]. Hemoglobin 22(1):83-5,1998 [abstract].
  41. WAYE J, WALKER L, PATTERSON M, CHUI DH: dentification of two new beta-thalassemia splice mutations: IVS-I-1(G-->C) and IVS-I (-2) (A-->C). Hemoglobin 26(1):87-9, 2002 [abstract].
  42. PAPANOTIRIOU I, TRAEGER-SYNODINOS J, et al: Association of unstable hemoglobin variants and heterozygous beta-thalassemia: example of a new variant Hb Acharnes or [beta53(D4) Ala --> Thr]. Am J Hematol 62(3):186-92, 1999 [abstract].

43. MA SK, HA SY, CHAN AY, CHAN GC, LAU YL, CHAN LC: Two novel beta-thalassemia alleles in the Chinese: the IVS-II-2 (-T) and nucleotide +8 (C-->T) beta-globin gene mutations. *Hemoglobin* 24(4):327-32, 2000 [abstract].
44. PRIMIGNANI P, TRAVI M, et al: Identification of the new polymorphism IVS1-91 C-->T in the beta globin gene. *Hum Mutat*; 14(3):272, 1999 [abstract].
45. BADENS C, JASSIM N, MARTINI N, MATTEI JF, ELION J, LENA-RUSSO D: Characterization of a new polymorphism, IVS-I-108 (T-->C), and a new beta-thalassemia mutation, -27 (A-->T), discovered in the course of a prenatal diagnosis. *Hemoglobin* 23(4):339-44, 1999 [abstract].
46. MUÑIZ A, MARTINEZ G, LAVINHA J, PACHECO P: Beta-thalassaemia in Cubans: novel allele increases the genetic diversity at the HBB locus in the Caribbean. *Am J Hematol* 64(1):7-14, 2000 [abstract].
47. AGARWAL S, HATTORI Y, AGARWAL SS: Rare beta-thalassemia mutations in Asian Indians. *Am J Hematol* 65(4):322-3, 2000 [abstract].
48. PAWAR AR, COLAH RB, MOHANTY D: A Novel beta+-thalassemia mutation (codon10GCC--> GCA) and a rare transcriptional mutation (-28<sup>A</sup> --> G) in Indians. *Blood* 89(10):3888-9, 1997.
49. MA SK, LEE AC, CHAN AY, CHAN LC: A novel AATAAA-->CATAAA mutation at the polyadenylation site of the beta-globin gene. *Br J Haematol* 115(1):230-1 [abstract].
50. FLATZ G, WILKE K, SYAGAILO YV, EIGEL A, HORST J: Beta-thalassemia in the German population: mediterranean, Asian and novel mutations. *Mutations in brief no.228. Online. Hum Mutat* 13(3):258, 1999 [abstract].
51. EL-KALLA S, MATHEWS AR: A novel beta-thalassemia mutation [codon 45 (-T)] in a pakistani family. *Hemoglobin* 21(6):499-503, 1997 [abstract].
52. NADKARNI A, SAKAGUCHI T, TAKAKU H et al: A novel beta0-thalassemia mutation at codon 55 (-A) and a rare 17 bp deletion at codons 126-131 in the Indian population. *Hemoglobin* 26(1):41-7, 2002 [abstract].
53. WAYE JS, ENG B, PATTERSON M, CHUI D, FERNANDES BJ: Novel beta-thalassemia mutation in a Canadian woman of British descent (codons 72/73, -AGTGA, +T). *Hemoglobin* 21(4):385-7, 1997 [abstract].
54. FELEKI X, NAJMABADI H, KARIMI-NEJAD R, CHRISTOPOULOS G, KLEANTHOUS M: Identification of a novel beta0-thalassemia mutation, codons 80/81 (-C), in an Iranian family. *Hemoglobin* 24(4):319-21, 2000 [abstract].
55. HATTORI Y; OHBA Y; SHIGETOMI Y et al: Two new beta-thalassemia mutations: codon 88 (CTG-->C--) and codons 83-86 (GGC/ACC/TTT/GCC-->GGCC). *Hemoglobin* 23(2):187-92, 1999 [abstract].
56. WAYE JS, WALKER L, LAFFERTY J, LEMIRE EG, CHUI DH: Dominant beta-thalassemia due to a newly identified frameshift mutation in exon 3 (codon 113, GTG-->TG). *Hemoglobin* 26(1):83-6, 2002 [abstract].

57. DEUTSCH S, DARBELLAY R, OFFORD R et al: Hb Iraq-Halabja beta10 (A7) Ala->Val (GCC-->GTC): a new beta-chain silent variant in a family with multiple Hb disorders. *Am J Hematol* 61(3):187-93, 1999 [abstract].
58. WAJCMAN H; LAHARY A; PROMÉ D et al: Hb Mont Saint Aignan [beta128(H6)Ala-->Pro]: a new unstable variant leading to chronic microcytic anemia. *Hemoglobin* 25(1):57-65, 2001 [abstract].
59. ROSATELLI MC, DOZY A, FAÀ V et al: Molecular characterization of beta-thalassemia in the Sardinian population. *Am J Hum Genet* 50(2):422-6, 1992 [abstract].
60. SCHILIRÒ G, DI GREGORIO F, SAMPERI P et al: Genetic heterogeneity of beta-thalassemia in southeast Sicily. *Am J Hematol* 48(1):5-11, 1995 [abstract].
61. ROSATELLI MC, TUVERI T, SCALAS MT et al: Molecular screening and fetal diagnosis of beta-thalassemia in the Italian population. *Hum Genet* 89(6):585-9, 1992 [abstract].
62. CAMASCHELLA C, MAZZA U, ROETTO A et al: Genetic interactions in thalassemia intermedia: analysis of beta-mutations, alpha-genotype, gamma-promoters, and beta-LCR hypersensitive sites 2 and 4 in Italian patients. *Am J Hematol* 48(2):82-7, 1995 [abstract].
63. KOLLIA P; KARABABA PH; SINOPOULOU K et al: Beta-thalassaemia mutations and the underlying beta gene cluster haplotypes in the Greek population. *Gene Geogr* 6(1-2):59-70, 1992 [abstract].
64. BAYSAL E et al: The beta-thalassaemia mutations in the population of Cyprus. *Br J Haematol*; 81(4):607-9, 1992 Aug. [Abstract]
65. BASAK AN; OZÇELIK H; OZER A; TOLUN A; AKSOY M; AGAOGLU L; RIDOLFI F; ULUKUTLU L; AKAR N; GÜRGEY The molecular basis of beta-thalassemia in Turkey. *Hum Genet*; 89(3):315-8, 1992 May. [Abstract]
66. AULEHLA-SCHOLZ, C., BASARAN, S., AGAOGLU, L., ARCASOY, A., HOLZGREVE, W., MINY, P., RIDOLFI, F., AND HORST, J: *Hum. Genet.*, 84:195, 1990 [Abstract]
67. TAMAGNINI GP; GONÇALVES P; RIBEIRO ML; KAEDA J; KUTLAR F; BAYSAL E; HUISMAN TH : Beta-thalassemia mutations in the Portuguese; high frequencies of two alleles in restricted populations. *Hemoglobin*; 17(1):31-40, 1993 Feb. [Abstract]
68. RIBEIRO, M.L., GONÇALVES, P., CUNHA, E., BENTO, C., ALMEIDA, H., PEREIRA, J., MARTIN NÚÑEZ, G., AND TAMAGNINI, G.P.: *Hemoglobin*, 21:261, 1997. [Abstract]
69. MILLAND, M., BERGE-LEFRANC, J.L., LENA, D., AND CARTOUZOU, G.: Oligonucleotide screening of beta thalassemia mutations in the south east of France. *Hemoglobin*, 11:317, 1987. [Abstract]
70. HALL, G.W., BARNETSON, R.A., AND THEIN, S.L.: *Br. J. Haematol.*, 82:548, 1992 [Abstract]

71. DIMOVSKI, A., EFREMOV, D.G., JANKOVIC, L., JURICIC, D., ZISOVSKI, N., STOJANOVSKI, N., NIKOLOV, N., PETKOV, G.T., REESE, A.L., STOMING, T.A., EFREMOV, G.D., AND HUISMAN, T.H.J.: Hemoglobin, 14:15, 1990. [Abstract]
72. PETKOV CO et al: Hemoglobin, 14:25, 1990 [Abstract]
73. ZAHED L: the spectrum of  $\beta$ -thalassemia mutations in the Arab populations. J Biomedicine and Biotechnology. 1:3 129-32. 2001
74. BAYSAL, E., SHARMA, S., WONG, S.C., JOGESSAR, V.B., AND HUISMAN, T.H.J.: Distribution of beta-thalassemia mutations in three Asian Indian populations with distant geographical locations. Hemoglobin, 18:201, 1994. [Abstract]
75. AHMED, S., PETROU, M., AND SALEEM, M.: Molecular genetics of beta-thalassaemia in Pakistan: a basis for prenatal diagnosis. Br. J. Haematol., 94:476, 1996. [Abstract]
76. RIBEIRO, M.L. AND TAMAGNINI, G.P.: Hemoglobin, 21:271, 1997. [Abstract]
77. GEORGE, E., LI, H-J., FEI, Y-J., REESE, A.L., BAYSAL, E., CEPREGANOVA, B., WILSON, J.B., GU, L-H., NECHTMAN, J.F., STOMING, T.A., LIU, J-C., CODRINGTON, J.F., AND HUISMAN, T.H.J.: Types of thalassemia among patients attending a large university clinic in Kuala Lumpur, Malaysia. Hemoglobin, 16: 51, 1992. [Abstract]
78. XU X; LIAO C; LIU Z; HUANG Y; ZHANG J; LI J; PENG Z; QIU L; XU Q: Antenatal screening and fetal diagnosis of beta-thalassemia in a Chinese population: prevalence of the beta-thalassemia trait in the Guangzhou area of China. Hum Genet; 98(2):199-202, 1996 Aug. [Abstract]
79. LAOSOMBAT V; FUCHAROEN SP; PANICH V; FUCHAROEN G; WONGCHANCHAILERT M; SRIROONGRUENG W; NOPPARATANA C; KENPITAK K; MAIPANG M; FUKUMAKI Y: Molecular basis of beta thalassemia in the south of Thailand. Am J Hematol; 41(3):194-8, 1992. [Abstract]
80. FUCHAROEN, S. AND WINICHAGOON, P.: Hemoglobinopathies in Southeast Asia: molecular biology and clinical medicine. Hemoglobin, in press, 1997. [Abstract]
81. LAIGM; SANGUANSEMSRI T; WIANGONON S; HUNDRIESER J; PAPE M; FLATZ Z: The spectrum of beta-thalassemia mutations in northern and northeastern Thailand. Hum Genet.; 84(1):47-50, 1998. [Abstract]
82. KEMPE, H.C.; SILVER, H. K.; O'BRIEN, D. *Pediatria Diagnóstico e Tratamento*. Oitava edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Pp 697. 1986
83. FAILACE, R. Hemograma Manual de Interpretações. Terceira edição. Porto Alegre: ArtMed. Pp 54 1995.
84. AESSOPOS, A; FARMAKIS, D; LOUKOPOS, D. Elastic tissue abnormalities resembling Pseudoxanthoma elasticum in Beta-thalassemia and the sickling

- syndromes. Review Article. 1997
85. LIVREA, M.A.; TESOIEREL; MAGGIO, A.; D'ARPA, D.; PINTAUDI, AM; PEDONE, E. *Oxidative Modification of Low-Density Lipoprotein and Atherogenetic Risk in  $\beta$ -Thalassemia*. Blood. Volume 92 número 10 15 de novembro de 1998.
  86. SONAKUL, D; SUWANAGOOL, P; SIRIVAIYAPONG, P; FUCHAROEN, S. *Distribution of pulmonary tromboembolism lesions in thalassemic patients*. Birth Defects 23:375, 1998
  87. BUTTHEP, P. BUNYARATVEJ, A; FUNAHARA, Y; KITAGUCHI, H; FUCHAROEN, S; SATO, S; BHAMARAPRAVI N; *Alterations in vascular endothelial cell-related plasma proteins in thalassemic patients and their correlation whit clinical symtoms*. Thomb Haemost 74:1045, 1995.
  88. CHIU DT-Y; VAN den BERG, J; KUYPERS FA; HUNG I-J; WEI J-S; LIU T-Z *Correlation of membrane lipid peroxidation with oxidation of hemoglobin variants: Possibly related to the rates of hemin release*. Free Radic Biol Med 21:89, 1996
  89. SCOTT, MD; VAN den BERG, JJM; REPKA, T; ROYER-FESSARD, P; HEBBEL, PR; BEUZARD, Y; LUBIN, B. *Effect of excess alpha-hemoglobin chains on cellular and membrane oxidation in model  $\beta$ -thalassemic erythrocytes*. Jclin Invest 91:1706, 1993
  90. MILLER, S.T.; SLEEPEER, L.; PEGELOW, H; ENOS L. E.; WANG, W.E.; WEINER, S.T.; SMITH, J; KINNEY, T.R. *Prediction of Adverse Outcomes in Children with Sickle cell Disease*. The New England of Medicine, Volume 342. Number 2. 13 de janeiro de 2000
  91. CAMASCHELA C, CAPPELLINI MD. *Thalassemia intermedia* . Haematologica 80:58-68, 1995.
  92. CAO, A. *Diagnosis of  $\beta$  thalassemia intermediaat presentation*. In: Fu charoen S, Rowley PT, Paul NW, eds. *Thalassemia: pathophysiology and management*. Part B. Vol. 23 of Birth defects: original articles series. New York: Alan R. Liss; 219-26, 1988.
  93. HUISMAN, THJ; CARVER, MFH; BAYSAL E. *A Syllabus of Thalssemia mutations*. The Sickle Cell anemia Foundation, Augusta, 1997.
  94. RIAMONGROL W, HARPER JC, DELHANTY JD, WELLS D. *Preimplantation genetic diagnostic protocols for  $\alpha$  and  $\beta$  thalassemias using multiplex fluorescnet PCR*. Pregnant Diagn.; 21 (9): 753-9 2001.
  95. LAU YL et al: *Prevalence and genotypes of alfa and beta thalassemia carries in Hong Kong- implications for population screening*. The N Engl J Med 336:1298-1301, 1997.
  96. [www.thalassemia.org](http://www.thalassemia.org).
  97. CAZZOLA M, DE STEFANO P, PONCHO F, LOCATELLI Y, BEGUIN Y. *Relationship between transfusion regimen and suppression of erythropoiesis in beta-thalassemia major*. Br J Haematol 89:473-8, 1995. [abstract]

98. PIOMELLI S. The management of patients with Cooley's anemia: transfusions and splenectomy. *Sem Hematol* 32:262–8, 1995.[abstract].
99. [www.thalassemia.com](http://www.thalassemia.com).
100. PROPPER RD, BUTTON LN, NATHAN DG. New approaches to the transfusion management of thalassemia. *Am Soc Hemat* 55:55-60, 1980.[abstract]
101. MONTALEMBERT M, GIROT R, MATTLINGER B, LEFRERE J-J. Transfusion-dependent thalassemia: viral complications (epidemiology and follow-up). *Sem Hematol* 32:280–7, 1995.
102. [www.thalassemia.com](http://www.thalassemia.com)
103. OLIVIERI NF, BRITTENHAM GM, ARMSTRONG SAM, BASRANRK, DANEMAN R, DANEMAN N, IWANCHKO RM, TALBOT AL, KOREN G: First prospective randomized trial of the iron chelators deferiprone and deferoxamine. *Blood* 86:249a, 1995(abstr, suppl1).
104. ZANI B, DIPALMA A, VULLO C: Psychosocial aspects of chronic illness in adolescents with thalassaemia major. *J Adolescence* 18:387, 1995.[abstract]
105. OLIVIERI NF, BRITTENHAM GM. Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood* 89:739–61, 1997.
106. KONTOGHIORGHES GJ, ALDOURI MA, SHEPPARD L, HOFFBRAND AV. 1,2-Dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one, an orally active chelator for treatment of iron overload. *Lancet* 1:1294–5, 1987.[abstract]
107. KONTOGHIORGHES GJ et al. Long-term trial with the oral iron chelator 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one (L1). *Br J Haematol* 76:295, 1990.[abstract]
108. SHALEV O, REPKA T, GOLDFARB A, GRINBERG L, ABRAHAMOV A, OLIVIERI NF, RACHMILEWITZ EA, HEBBEL RP. Deferiprone (L-1) chelates pathologic iron deposits from membranes of intact thalassemic and sickle RBC both in vitro and in vivo. *Blood* 86:2008–13, 1995.
109. AL-RAFAIE FN et al. Efficacy and possible adverse effects of the oral iron chelator 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one (L1) in thalassaemia major. *Blood* 80:593–9, 1992.
110. OLIVIERI NF et al. Iron-chelation therapy with oral deferiprone in patients with thalassemia major. *New Engl J Med* 332:918–22, 1995.
111. OLIVIERI NF et al. Long-term safety and effectiveness of iron-chelation therapy with deferiprone for thalassemia major. *New Engl J Med* 339:417–23, 1998.
112. HOFFBRAND AV, BARTLETT AN, VEYS PA, et al. Agranulocytosis and thrombocytopenia in patient with Blackfan-Diamond anaemia during oral chelator trial. *Lancet* 2:457, 1989.[abstract]
113. AL-REFAIE FN, WONKE B, HOFFBRAND AV. Deferiprone-associated myelotoxicity. *Eur J Haematol* 53:298–301, 1994.[abstract]

114. PIGA A, FACELLO S, GAGLIOTI C, PUCCI A, PIETRIBIASI F, ZIMMERMAN A. No progression of liver fibrosis in thalassemia major during deferiprone or desferrioxamine iron chelation. *Blood* 92(2):21b, 1998.
115. GRADY RW, BERDOUKAS VA, GIARDINA P. Iron Chelation: Combined therapy could be a better approach. *Blood* 92(2):16b, 1998.
116. WONKE B, WRIGHT C, HOFFBRAND AV. Combined therapy with deferiprone and desferrioxamine. *Br J Haematol* 103:361–4m, 1998.[abstract]
117. BERGERON RJ, WIEGAND J, BRITTENHAM GM. HBED: a potential alternative to deferoxamine for iron-chelating therapy. *Blood* 91:1446–52, 1998.
118. GRADY RW, GIARDINA PJ. Oral iron chelation: HBED may yet prove to be a very useful agent. *Blood* 92(2):17b, 1998.
119. BERGERON RJ, WIEGAND J, BRITTENHAM GM: HBED: the continuing development of a potential alternative to deferoxamine for iron-chelating therapy. *Blood* 93:370–5, 1999.
120. OLIVIERI NF: Reactivation of fetal hemoglobin in patients with  $\beta$ -thalassemia. *Semin Hematol* 33:24-42, 1996.[abstract]
121. DESIMONE J,HELLER P,HALL L,ZWIERS D: 5-Azacytidine stimulates fetal hemoglobin synthesis in anemic baboons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:4428 –31,1982.[abstract]
122. CHARACHE S et al: Treatment of sickle cell anemia with 5-azacytidine results in increased fetal hemoglobin production and is associated with nonrandom hypomethylation of DNA around the  $\gamma$ -globin gene complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:4842 –6,1983. [abstract]
123. HUMPHRIES RK,DOVER G,YOUNG NS,MOORE JG,CHARACHE S,LEY T, NIENHUIS AW: 5-Azacytidine acts directly on both erythroid precursors and progenitors to increase production of fetal hemoglobin. *J Clin Invest* 75:547 –57,1985.[abstract]
124. LEY TJ, DESIMONE J, NOGUCHI CT, TURNER PH, SCHECHTER AN, HELLER P, NIENHUIS AW: 5-Azacytidine increases  $\gamma$ -globin synthesis and reduces the proportion of dense cells in patients with sickle cell anemia. *Blood* 62:370 –80,1983.[abstract]
125. LEY TJ, DESIMONE J, ANAGNOU NP et al: 5-Azacytidine selectively increases  $\gamma$ -globin synthesis in a patient with  $\beta$ +thalassemia. *N Engl J Med* 307:1469-75, 1982.[abstract]
126. KOSHY M, DORN L, BRESSLER L, MOLOKIE R, LAVELLE D, TALISCHY N, HOFFMAN R, VAN OVERVELD W, DESIMONE J: 2-deoxy 5-azacytidine and fetal hemoglobin induction in sickle cell anemia. *Blood* 96:2379 –84, 2000.
127. CHARACHE S, TERRIN ML, MOORE RD, DOVER GJ, BARTON FB, ECKERT SV, MCMAHON RP, BONDS DR: Effect of hydroxyurea on



- frequency of painful crises in sickle cell anemia. *New Eng J Med* 332:1317–22, 1995.
128. WEATHERALL DJ: Thalassemia. In: Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Leder P, Majerus PW, Varmus H, eds. *The molecular basis of blood diseases*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 1993.
  129. STAMATOYANNOPOULOS JA, NIENHUIS AW: Therapeutic approaches to hemoglobin switching in treatment of hemoglobinopathies. *Annu Rev Med* 43:497-521, 1992.[abstract]
  130. ZENG Y-T, HUANG S-Z, REN Z-R, LU Z-H, ZENG F-Y, SCHECHTER AN, RODGERS GP: Hydroxyurea therapy in beta-thalassaemia intermedia: improvement in haematological parameters due to enhanced beta-globin synthesis. *Br J Haematol* 90:557–63, 1995.
  131. LOUKOPOULOS D, VOSKARIDOU E, STAMOULAKATOU A, PAPASSOTIRIOU Y, KALOTYCHOU V, LOUTRADI A, COZMA G, TSIARTA H, PAVLIDES N: Hydroxyurea therapy in thalassemia. *Ann NY Acad Sci* 850:120–8, 1998.[abstract]
  132. ALBERTO FL, ARRUDA VR, LIMA CSP, BORDIN S, MARTINS J, SAAD STO, COSTA FF. Long-term hydroxyurea therapy in thalassemia intermedia and thalassemia major patients. *Blood* 92(1): 366, 1998.
  133. HAJJAR FM, PEARSON HA. Pharmacologic treatment of thalassemia intermedia with hydroxyurea. *J Pediatr* 125:490-492, 1994.[abstract]
  134. AKER M, PERRY D, DOVER G, RACHMILEWITZ EA. The effect of combined recombinant human erythropoietin and hydroxyurea on erythropoiesis in  $\beta$ -thalassemia intermedia. *Blood* 84:Suppl:257a-257a., 1994.
  135. ARRUDA VR, LIMA CS, SAAD ST, COSTA FF. Successful use of hydroxyurea in beta-thalassemia major (letter). *N Engl J Med* 336:964, 1997.
  136. RUND D, RACHMILEWITZ. New trends in the treatment of  $\beta$ -thalassemia. *Crit Rev Onc Hemat* 33:105-118, 2000.
  137. PERRINE SP, GREENE MF, FALLER DV. Delay in the fetal globin switch in infants of diabetic mothers. *N Engl J Med* 312:334–8, 1985.
  138. PERRINE SP, RUDOLPH A, FALLER DV, ROMAN C, COHEN RA, CHEN SJ, KAN YW: Butyrate infusions in the ovine fetus delay the biologic clock for globin gene switching. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8540 –2, 1988.[abstract]
  139. CONSTANTOULAKIS P, KNITTER G, STAMATOYANNOPOULOS G: On the induction of fetal hemoglobin by butyrates: In vivo and in vitro studies with sodium butyrate and comparison of combination treatments with 5-AzaC and AraC. *Blood* 74:1963 –71, 1989.
  140. PERRINE SP, MILLER BA, FALLER DV, COHEN RA, VICHINSKY EP, HURST D, LUBIN BH, PAPAYANNOPOULOU T: Sodium butyrate enhances fetal globin gene expression in erythroid progenitors of patients with Hb SS and beta thalassemia. *Blood* 74:454 –9, 1989.

141. BLAU CA, CONSTANTOULAKIS P, SHAW CM, STAMATOYANNOPOULOS G: Fetal hemoglobin induction with butyric acid: Efficacy and toxicity. *Blood* 81:529–37, 1993.
142. DOVER GJ, BRUSILOW S, CHARACHE S: Induction of fetal hemoglobin production in subjects with sickle cell anemia by oral sodium phenylbutyrate. *Blood* 84:339–43, 1994.
143. PERRINE SP, GINDER GD, FALLER DV, DOVER GH, IKUTA T, WITKOWSKA H, CAI S, VICHINSKY EP, OLIVIERI NF: A short-term trial of butyrate to stimulate fetal-globin-gene expression in the  $\alpha$ -globin disorders. *N Engl J Med* 328:81–6, 1993.
144. SHER GD, GINDER GD, LITTLE J, YANG S, DOVER GJ, OLIVIERI NF: Extended therapy with intravenous arginine butyrate in patients with hemoglobinopathies. *N Engl J Med* 332:1606–10, 1995.
145. PERRINE SP, OLIVIERI NF, FALLER DV, VICHINSKY EP, DOVER GJ, GINDER GD. Butyrate derivatives: new agents for stimulating fetal globin production in the beta-globin disorders. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 16:67–71, 1994. [abstract]
146. DOVER GJ. Hemoglobin switching protocols in thalassemia: experience with sodium phenylbutyrate and hydroxyurea. *Ann NY Acad Sci* 850:80–6, 1998. [abstract]
147. COLLINS AF, PEARSON HA, GIARDINA P, MCDONAGH KT, BRUSILOW SW, DOVER GJ: Oral sodium phenylbutyrate therapy in homozygous beta thalassemia: a clinical trial. *Blood* 85:43–9, 1995.
148. SHARMA S, NISBET-BROWN E, REES DR, OLIVIERI NF: Sodium phenylbutyrate therapy in infants and children with thalassemia. *Blood* 92(1):530<sup>a</sup>, 1998.
149. AL-KHATTI A, VEITH RW, PAPAYANNOPOULOU T, FRITSCH EF, GOLDWASSER E, STAMATOYANNOPOULOS G: Stimulation of fetal hemoglobin synthesis by erythropoietin in baboons. *New Eng J Med* 317:415–20, 1987.[abstract]
150. RACHMILEWITZ EA, AKER M, PERRY D, DOVER G: Sustained increase in hemoglobin, RBC and hematocrit following long term administration of recombinant human erythropoietin to patients with beta thalassemia intermedia. *Br J Haematol* 90:341–5, 1995.
151. NISLI G, KAVAKLI K, VERGIN C, CETINGUL N: Recombinant human erythropoietin trial in thalassemia intermedia. *J Trop Pediatr* 42:330-4, 1996.[abstract]
152. RACHMILEWITZ EA, AKER M: The role of recombinant human erythropoietin in the treatment of thalassemia. *Ann NY Acad Sci* 850:129–38, 1998. [abstract]
153. RUND D, FIBACH E, GOLDFARB A, FRIEDBERG A, RACHMILEWITZ

- EA: Heme arginate therapy for beta-thalassemia: in vitro and in vivo effects. *Acta Hemat* 100:82–4, 1998.
154. LOUKOPOULOS D, VOSKARIDOU E, STAMOULAKATOU A, PAPASSOTIRIOU Y, KALOTYCHOU V, LOUTRADI A, COZMA G, TSIARTA H, PAVLIDES N: Hydroxyurea therapy in thalassemia. *Ann NY Acad Sci* 850:120–8, 1998.[abstract]
  155. RUND D, RACHMILEWITZ E: New trends in the treatment of  $\beta$ -thalassemia. *Crit Rev Onc Hemat* 33:105-118, 2000;.
  156. SCOTT MD, EATON JW: Thalassaemic erythrocytes: cellular suicide arising from iron and glutathione-dependent oxidation reactions? *Br J Haematol* 91:811–9, 1995.
  157. GRINBERG LN, RACHMILEWITZ EA, NEWMARK H: Protective effects of rutin against hemoglobin oxidation. *Biochemical Pharmacology* 48:643–9, 1994.
  158. GRINBERG LN, NEWMARK H, KITROSSKY N, RAHAMIN E, CHEVION M, RACHMILEWITZ EA: Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. *Biochem Pharmacol* 54:973–8, 1997.[abstract]
  159. THOMAS ED, BUCKER CD, SANDERS JE: Marrow transplantation for thalassemia. *Lancet* 2:227–9, 1982.[abstract]
  160. PIGA A, LONGO F, VOI V, FACELLO S, MINIERO R, DRESOW B: Late effects of bone marrow transplantation for thalassemia. *Ann NY Acad Sci* 850:294–9, 1998.
  161. DE SIMONE M, OLIOSO P, DI BARTOLOMEO P, DI GIROLAMO G, FARELLO G, PALUMBO M, PAPALINETTI G, BAVARO P, ANGRILLI G, TORLONTANO G: Growth and endocrine function following bone marrow transplantation for thalassemia. *Bone Marrow Transplant* 15:227–33, 1995.
  162. COHEN A, VAN LINT MT, UDERZO C, ROVELLI A, LAVAGETTO A, VITALE V, MORCHIO A, LOCASCIULLI A, BACIGALUPO A, ROMANO C: Growth in patients after allogeneic bone marrow transplant for hematological diseases in childhood. *Bone Marrow Transplant* 15:343–8, 1995.
  163. DE SIMONE M et al: Growth after recombinant human growth hormone (rhGH) treatment in transplanted thalassemic patients. *Bone Marrow Transplant* 20:567–73,1997.
  164. GIARDINI C et al: Desferrioxamine therapy accelerates clearance of iron deposits after bone marrow transplantation for thalassemia. *Br J Haemat* 89:868–73, 1995.[abstract]
  165. LUCARELLI G et al: Bone marrow transplantation in thalassemia: the experience of Pesaro. *Ann NY Acad Sci* 1998;850:270–5.[abstract]
  166. LUCARELLI G, GIARDINI C, BARONCIANI D: Bone marrow transplantation in thalassemia. *Sem Hematol* 1995;32:297–303.[abstract]

167. LUCARELLI G et al: Bone Marrow Transplantation in Adult Thalassemic Patients *Blood* 93(4):1164-1167, 1999.
168. G LUCARELLI et al: Marrow transplantation for patients with thalassemia: results in class 3 patients. *Blood* 87(5):2082-2088, 1996.
169. ANGELUCCI E et al: Phlebotomy to reduce iron overload in patients cured of thalassemia by bone marrow transplantation. *Blood* 90:994-997, 1997.
170. ISSARAGRISIL S et al: Brief report: transplantation of cord-blood stem cells into a patient with severe thalassemia. *New Engl J Med* 332:367-9, 1995.
171. MINIERO R et al: Cord blood transplantation (CBT) in hemoglobinopathies: Eurocord. *Bone Marrow Transplant* 22:S78-9, 1998.
172. YESILPEK MA, HAZAR V, KÜPESIZ A, KÝZÝLO A, UGUZ A AND YEGIN O: Peripheral blood stem cell transplantation in children with beta-thalassemia. *Bone Marrow Transplantation* 28:1037-1040, 2001
173. BALLEEN KK et al: Bigger is better: maternal and neonatal predictors of hematopoietic potential of umbilical cord blood units *Bone Marrow Transplantation* 27:7-14, 2001.
174. FLAKE AW, ZANJANI ED: In utero transplantation for thalassemia. *Ann NY Acad Sci* 850:300-11, 1998.[abstract]
175. TOURAINE JL. In-utero transplantation of fetal liver stem cells into human fetuses. *Hum Reprod* 7:44-81, 1992.[abstract]
176. TOURAINE JL, RAUDRANT D, ROYO C, REBAUD A, RONCAROLO MG, SOUILLET G, PHILIPPE N, TOURAINE F, BETUEL H: In-utero transplantation of stem cells in bare lymphocyte syndrome (letter). *Lancet* 1989;1:1382.[abstract]
177. WESTGREN M et al: Lack of evidence of permanent engraftment after in utero fetal stem cell transplantation in congenital hemoglobinopathies. *Transplantation* 61:1176-9, 1996.[abstract]
178. HAYWARD A et al: Microchimerism and tolerance following intrauterine transplantation and transfusion for alpha-thalassemia-1. *Fetal Diagn Ther* 13:8-14, 1998.[abstract]
179. COSTANTINI F, CHADA K, MAGRAM J: Correction of murine beta-thalassemia by gene transfer into the germ line. *Science* 233:1192-4, 1986.
180. SADELAIN M. Genetic treatment of the haemoglobinopathies: recombinations and new combinations. *Br J Haematol* 98:247-53, 1997.
181. BODINE DM, DUNBAR CE, GIRARD LJ, SEIDEL NE, CLINE AP, DONAHUE RE, ORLIC D: Improved amphotropic retrovirus-mediated gene transfer into hematopoietic stem cells. *Ann NY Acad Sci* 850:139-50, 1998.
182. PAWLIUK R, BACHELOT T, RAFTOPOULOS H, KALBERER C,

- HUMPHRIES RK, BANK A, LEBOULCH P. RETROVIRAL:vectors aimed at the gene therapy of human beta-globin gene disorders. *Ann NY Acad Sci* 850:151–62, 1998.
183. HANANIA E et al: Results of MDR-1 vector modification trial indicate that granulocyte:macrophage colony-forming unit cells do not contribute to posttransplant hematopoietic recovery following intensive systemic therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:15346–51, 1996.
184. DALYOT N, OPPENHEIM A: Efficient transfer of the complete human beta-globin gene into human and mouse hemopoietic cells via SV40 pseudovirions, *Gene Transf. Gene Ther*47:135-43, 1989.
185. WANG GM, SEIDMAN MM, GLAZER PM: Mutagenesis in mammalian cells induced by triple helix formation and transcription-coupled repair. *Science* 271:802–5, 1996.
186. SIERAKOWSKA H, SAMBADE MJ, AGRAWAL S, KOLE R: Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12840–4, 1996.
187. Encoutering Counseling Issue in Care  
<http://www.nsgc.org/resourse.link.html>.
188. RINOIN,D.L.;CONNOR,J.M.;PYERITZ,R.E..Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics, 3<sup>a</sup>edição, 1997.