

# Distribuição das mutações da $\beta$ -talassemia em Fortaleza, Ceará

Primeira submissão em 08/06/10  
Última submissão em 18/08/10  
Aceito para publicação em 20/08/10  
Publicado em 20/12/10

## Distribution of $\beta$ -thalassemia mutations in Fortaleza, Ceará

Lilianne Brito da Silva Rocha<sup>1</sup>; Michelle Freitas Martins<sup>1</sup>; Romélia Pinheiro Gonçalves<sup>2</sup>

unitermos	resumo
Prevalência	<p><b>Introdução:</b> As mutações IVS-I-1, IVS-I-6 e CD 39 foram estudadas em 14 pacientes portadores de <math>\beta</math>-talassemia, da população de Fortaleza, capital do Ceará. <b>Objetivo:</b> Fornecer informações sobre a caracterização molecular dos pacientes <math>\beta</math>-talassêmicos de Fortaleza, contribuindo para traçar o perfil das mutações desta hemoglobinopatia na região Nordeste e no Brasil. <b>Métodos:</b> A <math>\beta</math>-talassemia foi diagnosticada pelo estudo hematológico realizado no contador automático de células sanguíneas, com revisão de lâminas, pelo teste de resistência globular osmótica em NaCl a 0,36% e pela eletroforese em pH alcalino em fitas de acetato de celulose. O DNA foi isolado de leucócitos a partir de amostras de sangue total. A análise das mutações foi realizada por meio da técnica da reação em cadeia mediada pela polimerase alelo-específica (PCR-AE), sendo analisadas as mutações CD 39, IVSI-1, IVSI-6 e IVSI-110 seguindo-se o protocolo do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) da Universidade Estadual Paulista (UNESP). <b>Resultados:</b> A distribuição das mutações identificadas foi: IVS-I-1 (14,3%), IVS-I-6 (35,7%) e CD 39 (21,4%). Os demais talassêmicos (28,6%) não apresentaram nenhuma das mutações estudadas. A maior frequência da mutação IVS-I-6 está conforme o esperado, uma vez que estudos demonstram que esta mutação está mais presente na região Nordeste, assim como a mutação IVS-I-1 na região Sul e a IVSI-110 e CD39 na região Sudeste do país. <b>Conclusão:</b> Esses resultados demonstram o perfil das mutações da <math>\beta</math>-talassemia na região Nordeste, contribuindo, assim, para o estudo da distribuição destas mutações no Brasil.</p>
Mutações	
$\beta$ -talassemia	

## abstract

## key words

**Introduction:** IVS-I-1, IVS-I-6 and CD 39 mutations were studied in 14 patients with  $\beta$ -thalassemia from the population of Fortaleza, capital of Ceará. **Objective:** To provide information on the molecular characterization of  $\beta$ -thalassemia patients from Fortaleza, aiding to define the mutation profile of this hemoglobinopathy in the Northeast region and Brazil. **Methods:**  $\beta$ -thalassemia was diagnosed by hematological study conducted in automatic blood cell counter, with review of slides through the test of globular osmotic resistance in NaCl 0.36% and the alkaline electrophoresis on cellulose acetate strips. DNA was isolated from leukocytes extracted from whole blood samples. The analysis of mutations was performed using the technique of allele specific polymerase chain reaction. CD 39, IVSI-1-6 and IVSI-110 were evaluated according to the protocol used in the Hemoglobin and Genetics Laboratory of Hematologic Diseases (LHGDH/UNESP). **Results:** The distribution of identified mutations was: IVS-I-1 (14.3%), IVS-I-6 (35.7%) and CD 39 (21.4%). The other thalassemia patients (28.6%) showed none of the studied mutations. The highest frequency was IVS-I-6 as anticipated, since studies show that this mutation is more prevalent in the Northeast, as well as IVS-I-1 in the South, and IVSI-110 and CD39 in Southeast of the country. **Conclusion:** These results demonstrate the profile of  $\beta$ -thalassemia mutations in the Northeast region, thus contributing to the study of their distribution in Brazil.

Prevalence  
Mutations  
 $\beta$ -thalassemia

1. Mestra em Patologia Tropical pela Universidade Federal do Ceará (UFC).

2. Professora doutora associada da UFC.

## Introdução

As talassemias são hemoglobinopatias caracterizadas por redução na produção de uma ou mais cadeias polipeptídicas que formam o tetrâmero de hemoglobina<sup>(8)</sup>.

A  $\beta$ -talassemia é a forma mais importante das talassemias devido à elevada taxa de morbidade e mortalidade. Na  $\beta$ -talassemia ocorre uma alteração quantitativa da síntese de globinas beta decorrente de uma mutação em ponto, o que resulta na deleção ou inserção de poucos nucleotídeos<sup>(12)</sup>. É classificada como talassemia beta zero ( $\beta^0$ ), quando há ausência na síntese de globinas, e talassemia beta mais ( $\beta^+$ ), quando ocorre uma redução na síntese de globinas<sup>(25)</sup>.

A doença apresenta heterogeneidade molecular e expressão fenotípica variável, podendo ser assintomática ou resultar em uma anemia que pode variar de leve a intensa<sup>(14, 22)</sup>. O diagnóstico da  $\beta$ -talassemia é feito a partir de dados clínicos, laboratoriais e moleculares, embasado fundamentalmente na gravidade da anemia que se apresenta microcítica e hipocrômica nas três formas: maior, intermediária e menor<sup>(6)</sup>.

A talassemia maior, a forma grave, é denominada de talassemia beta homocigota; a talassemia menor, de heterocigota; e a talassemia intermediária é definida por uma classificação mais clínica do que genética ou laboratorial<sup>(25)</sup>.

Entre as mutações mais estudadas da  $\beta$ -talassemia estão:  $\beta^0$  CD 39,  $\beta^+$  IVS-I-110,  $\beta^0$  IVS-I-1,  $\beta^+$  IVS-I-6<sup>(16)</sup>.

A mutação no códon 39 é um tipo de mutação que forma códons de terminação na região codificadora, interrompendo a tradução e impedindo a produção de cadeias  $\beta$ , levando ao genótipo  $\beta^0$ .

A mutação IVS-I-110 é um exemplo de defeito que afeta o processamento do RNA, criando um sítio adicional de *splicing*. Nesse tipo de mutação ocorre a substituição de A→G no nucleotídeo 110 do íntron 1, produzindo uma forma grave de talassemia  $\beta^+$ .

A mutação IVS-I-1 resulta da troca de G→A no primeiro nucleotídeo do primeiro íntron, que impede o processamento do RNA para retirar o íntron, impedindo a síntese de cadeias  $\beta$  e levando à talassemia  $\beta^0$ <sup>(11, 23, 26)</sup>.

A mutação IVS-I-6 resulta da troca de T→C no nucleotídeo 6 do íntron 1, resultando na talassemia  $\beta^+$  leve. É um exemplo de mutação que afeta o processamento do RNA por redução da eficácia do *splicing*<sup>(24)</sup>.

As mutações são regionalmente específicas, dividindo-se em quatro grupos de países: Mediterrâneo, Índia, Sudeste Asiático e África, sendo que cada população tem o seu

espectro próprio de mutação, com um ou alguns alelos predominantes<sup>(13)</sup>. Há atualmente mais de 200 alelos mutantes descritos<sup>(14)</sup>. A distribuição e a frequência de mutações das hemoglobinopatias, especialmente para a  $\beta$ -talassemia, já foram caracterizadas na maioria dos países<sup>(1, 5, 13)</sup>.

No Brasil, tanto a  $\alpha$  quanto a  $\beta$ -talassemia são resultantes da grande miscigenação da população brasileira com a imigração ocorrida no final do século XIX e início do século XX, em que o Brasil recebeu cerca de 5 milhões de imigrantes europeus e asiáticos, principalmente representados pelos italianos que se estabeleceram no Sul e no Sudeste do país<sup>(3, 4)</sup>. As mutações  $\beta$ -talassêmicas encontradas no Sul e Sudeste brasileiros, representados por Porto Alegre, Ribeirão Preto e São Paulo, são IVS-I-1, IVS-I-6, IVS-I-110 e códon 39<sup>(7, 10, 20)</sup>. No Nordeste, representado pela cidade de Recife, também foi encontrada a mutação IVS-I-5<sup>(1)</sup>.

O presente estudo teve como objetivo fornecer informações importantes relacionadas com a caracterização molecular dos pacientes com  $\beta$ -talassemia em Fortaleza, com a finalidade de traçar o perfil das mutações  $\beta$ -talassêmicas na região Nordeste, contribuindo, assim, para o estudo da distribuição destas mutações no Brasil.

## Métodos

Trata-se de um estudo de corte transversal em 15 pacientes com diagnósticos clínico e laboratorial de  $\beta$ -talassemia atendidos no ambulatório do serviço de hematologia de um hospital de referência em Fortaleza, residentes no estado do Ceará, todos voluntários e de ambos os sexos. A amostra representa 50% do total de pacientes  $\beta$ -talassêmicos cadastrados no centro. Todos os pacientes eram portadores de  $\beta$ -talassemia menor. O consentimento informado foi obtido de todos os indivíduos e o estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Ceará (UFC).

A  $\beta$ -talassemia foi diagnosticada pelo estudo hematológico realizado no contador automático de células sanguíneas, Sysmex KX-21N, com revisão de lâminas para análise da morfologia eritrocitária<sup>(2, 15)</sup>, pelo teste de resistência globular osmótica em NaCl a 0,36% e pela eletroforese em pH alcalino em fitas de acetato de celulose<sup>(17)</sup>. O DNA foi isolado de leucócitos a partir de amostras de sangue total, seguindo o protocolo de Sambrook *et al.*<sup>(21)</sup>. A análise das mutações foi realizada por meio da técnica da reação em cadeia mediada pela polimerase alelo específica (PCR-AE), sendo analisadas as mutações CD 39, IVSI-1, IVSI-6 e

IVSI-110, seguindo o protocolo do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas da Universidade Estadual Paulista (LHGDH/UNESP).

## Resultados

As mutações identificadas nos 15 pacientes com  $\beta$ -talassemia menor foram: IVS-I-1 (6,7%), IVS-I-6 (33,3%), CD 39 (26,7%) e outras (33,3%) (**Tabela 1**).

As **Figuras 1, 2 e 3** mostram exemplos de indivíduos portadores de  $\beta$ -talassemia heterozigota para IVS-I-1, homozigota para IVS-I-6 e heterozigota para CD 39, respectivamente. A **Figura 4** demonstra a ausência do alelo mutante para a mutação IVS-I-110.

## Discussão

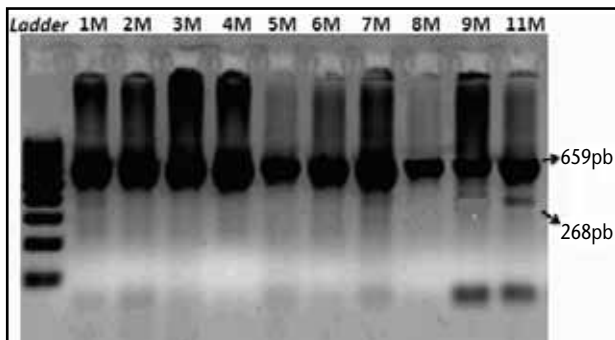
Aproximadamente 7% da população mundial são portadores de  $\beta$ -talassemia. Nascem por ano 300 mil a 500 mil crianças com a forma severa desta doença<sup>(18)</sup>.

**Distribuição dos indivíduos portadores de  $\beta$ -talassemia menor quanto ao tipo de mutação**

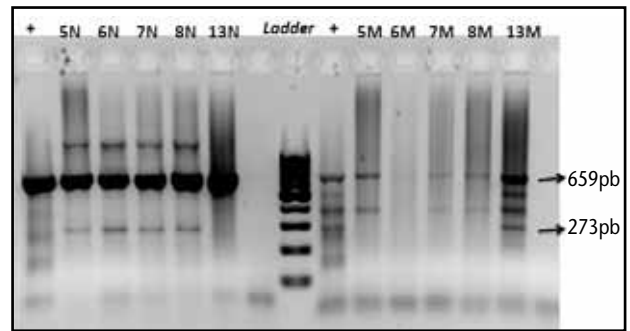
**Tabela 1**

Mutação	Número de indivíduos (%)
IVSI-1	1 (6,7)
IVSI-6	5 (33,3)
IVSI-110	0
CD 39	4 (26,7)
Outras*	5 (33,3)
Total	15 (100%)

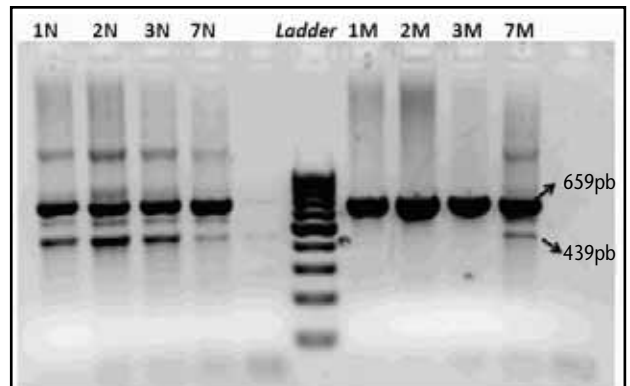
\*Mutações não caracterizadas no estudo.



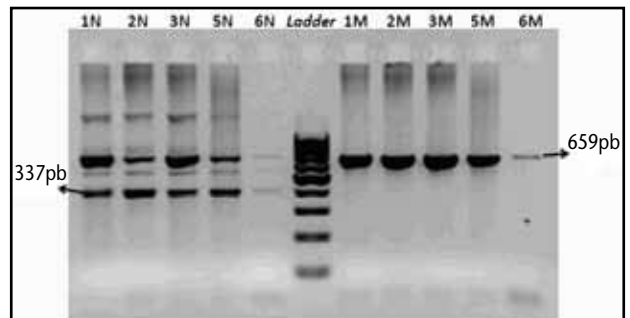
**Figura 1** – Foto de um gel de agarose a 1,5% com amostra de heterozigoto para a mutação IVS-I-1 no indivíduo de número 11  
N: alelo normal; M: alelo mutante; Ladder: marcador de peso molecular 100pb.



**Figura 2** – Foto de um gel de agarose a 1,5% com amostra de homozigoto para a mutação IVS-I-6 no indivíduo de número 13  
N: alelo normal; M: alelo mutante; Ladder: marcador de peso molecular 100pb; (+): controle positivo.



**Figura 3** – Foto de um gel de agarose a 1,5% com amostra de heterozigoto para a mutação CD 39 no indivíduo de número 7  
N: alelo normal; M: alelo mutante; Ladder: marcador de peso molecular 100pb.



**Figura 4** – Foto de um gel de agarose a 1,5% com amostra sem o alelo mutante para a mutação IVS-I-110  
N: alelo normal; M: alelo mutante; Ladder: marcador de peso molecular 100pb.

A elevada imigração representada por portugueses, africanos, asiáticos e indígenas tem colaborado para a diferente distribuição das mutações da  $\beta$ -talassemia no nosso país<sup>(18)</sup>.

No presente estudo, entre as mutações caracterizadas, a IVS-I-6 (T→C) foi a mais presente, sendo encontrada em 33,3% dos pacientes. Essa mutação tem maior prevalência no Mediterrâneo, em populações do centro de Portugal, onde corresponde a 29,4% dos alelos<sup>(19)</sup>, assim como nas regiões montanhosas da Palestina, onde compõe 48,5%

dos alelos da população<sup>(9)</sup>. Este resultado está conforme o esperado, uma vez que a colonização do estado do Ceará foi realizada principalmente por portugueses. Araújo *et al.*<sup>(1)</sup> encontraram resultados similares na cidade de Recife: de 86 cromossomos, 17 são homocigotos e sete heterocigotos para a mutação IVS-I-6<sup>(1)</sup>.

Estudos demonstram um perfil diferente de mutações da  $\beta$ -talassemia de acordo com cada região brasileira. Maior

frequência da mutação IVSI-6 foi encontrada no Nordeste; da IVSI-110 e da CD39, nas regiões Sudeste e Sul do país<sup>(1, 7, 10, 20)</sup> (**Tabela 2**).

Os resultados apresentados são relevantes para a obtenção de informações sobre a distribuição das mutações da  $\beta$ -talassemia em Fortaleza, contribuindo para a caracterização molecular da doença na região Nordeste e no Brasil.

**Tabela 2** Distribuição molecular das mutações mais frequentes da  $\beta$ -talassemia nas cidades de São Paulo, Porto Alegre, Recife e Fortaleza

Mutações	Ribeirão Preto <sup>(7)</sup>	São Paulo <sup>(10)</sup>	Porto Alegre <sup>(20)</sup>	Recife <sup>(1)</sup>	Fortaleza*
IVSI-1	–	4,3%	12,9%	5,9%	14,3%
IVSI-6	27,0%	18,6%	9,5%	53,6%	35,7%
IVSI-110	15,0%	18,6%	18,1%	3%	0%
CD 39	47,0%	54,3%	50,9%	7,7%	21,4%
Outras	11,0%	4,8%	8,6%	14,9%	28,9%

\*Presente estudo.

## Referências

1. ARAÚJO, A. S. *et al.* A different molecular pattern of  $\beta$ -thalassemia mutations in Northeast Brazil. *Hemoglobin*, v. 27, p. 211-7, 2003.
2. BEUTLER, E. The common anemias: review. *J Am Med Assoc*, v. 259, p. 2433-7, 1988.
3. BONINI-DOMINGOS, C. R. *et al.* Estudo de hemoglobinas anormais em doadores de sangue e recém-nascidos de São José do Rio Preto. *NewsLab*, v. 41, p. 92-8, 2000.
4. BONINI-DOMINGOS, C. R. Thalassemia screening in Brazil: results for 20 years. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 26, n. 4, p. 288-9, 2004.
5. CABEDA, J. M. *et al.* Unexpected pattern of  $\beta$ -globin mutations in  $\beta$ -thalassaemia patients from northern Portugal. *Br J Haematol*, v. 105, n. 1, p. 68-74, 1999.
6. CAO, A. *et al.* Molecular diagnosis and carrier screening for  $\beta$ -thalassemia. *JAMA*, v. 278, p. 1273-7, 1997.
7. COSTA, F. F.; TAVELA, M. H.; ZAGO, M. A. Molecular basis of beta-thalassemia in Brazil. *Blood*, v. 76, n. 10, p. 58, 1990.
8. CUNNINGHAM, M. J. Update on thalassemia: clinical care and complications. *Pediatr Clin North Am*, v. 55, n. 2, p. 447-60, 2008.
9. EL-LATIF, M. A. *et al.* The  $\beta$ +IVSI-6 (T→C) mutation accounts for half of the thalassemia chromosomes in the Palestinian populations of the mountain regions. *Hemoglobin*, v. 26, n. 1, p. 33-40, 2002.
10. FONSECA, S. F. *et al.* Genetic analysis of  $\beta$ -thalassemia major and  $\beta$ -thalassemia intermedia in Brazil. *Hemoglobin*, v. 22, n. 3, p. 197-207, 1998.
11. FORGET, B. G. Molecular mechanisms of  $\beta$ -thalassemia. In: STEINBERG, M. H. *et al.* *Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management*. 1. ed. New York: Cambridge University Press, 2001. cap. 12, p. 252-76.
12. HATTORI, Y. Globin gene mutation is a model of genetic abnormalities. *Rinsho Byori*, v. 47, n. 3, p. 244-51, 1999.
13. HENDERSON, S. *et al.* Incidence of haemoglobinopathies in various populations: the impact of immigration. *Clin Biochem*, v. 42, n. 18, p. 1745-56, 2009.
14. HUISMAN, H. J. *et al.* *Hb Var: a database of human hemoglobin variants and thalassemias, summaries of mutation categories*. Pennsylvania University USA and McMaster University in Canada, 1996. Disponível em: <<http://globin.cse.psu.edu>>. Acesso em: 17 ago. 2008.
15. LEWIS, S. M.; BAIN, B. J.; BATES, I. *Hematologia prática de Dacie e Lewis*. Porto Alegre: Artmed, 2006.
16. NAOUM, P. C. *Hemoglobinopatias e talassemias*. São Paulo: Sarvier, 1997.
17. MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. *J Clin Path*, v. 18, p. 90-192, 1965.
18. PREMAWARDHENA, A. *et al.* Genetic determinants of jaundice and gallstones in haemoglobin  $\beta$ -thalassaemia. *The Lancet*, v. 357, p. 1945-6, 2001.
19. RIBEIRO, M. L. *et al.* Genetic heterogeneity of  $\beta$ -thalassemia in populations of the Iberian peninsula. *Hemoglobin*, v. 21, n. 3, p. 261-9, 1997.

20. REICHERT, V. C. D. *et al.* Identification of  $\beta$ -thalassemia mutations in South Brazilians. *Ann Hematol*, v. 87, n. 5, p. 381-4, 2008.
21. SAMBROOK, J. *et al.* *Hb Var*: a database of human hemoglobin variants and thalassemias, summaries of mutation categories. Pennsylvania University USA and McMaster University in Canadá, 1996. Disponível em: <<http://globin.cse.psu.edu>>. Acesso em: 17 ago. 2008.
22. SONATI, M. F.; COSTA, F. F. Genética das doenças hematológicas. *J Pediatr*, v. 84, p. S40-S51, 2008.
23. THEIN, S. L. Genetic modifiers of  $\beta$ -thalassemia. *Haematologica*, v. 90, n. 5, p. 649-60, 2005.
24. THEIN, S. L.  $\beta$ -thalassaemia. *Baillière's Clin Haematol*, v. 11, n. 1, p. 91-126, 1998.
25. WEATHERALL, D. J. Disorders of globin synthesis: the thalassemias. In: WILLIAMS, W. J. *et al.* *Hematology*. New York: McGraw Hill Book Company, 2006.
26. ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. *Hematologia: fundamentos e prática*. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 31, p. 309-28.

---

**Endereço para correspondência**

Liliane Brito da Silva Rocha  
Rua Silva Paulet, 2.830/ 1.104 – Aldeota  
CEP: 60120-020 – Fortaleza-CE