

# Bases Moleculares das Doenças Genéticas

## *Princípios Gerais e Lições a partir das Hemoglobinopatias*

O termo *doença molecular*, introduzido há mais de 6 décadas, refere-se a distúrbios nos quais o evento primário causador da doença é uma alteração, herdada ou adquirida, que afeta um gene(s), sua(s) estrutura(s) e/ou sua expressão. Neste capítulo, inicialmente abordaremos os mecanismos genéticos e bioquímicos subjacentes aos distúrbios monogênicos ou de um único gene. Ilustraremos estes distúrbios no contexto de suas consequências moleculares e clínicas, usando como exemplo as doenças hereditárias das hemoglobinas — as hemoglobinopatias. Essa visão geral de mecanismos será detalhada no Capítulo 12, incluindo outras doenças genéticas que ilustram princípios adicionais da genética na medicina.

Uma doença genética ocorre quando uma alteração no DNA de um gene essencial modifica a quantidade ou função dos seus produtos gênicos, ou ambos — tipicamente o RNA mensageiro (RNAm) e a proteína, e ocasionalmente RNAs não codificadores específicos (RNAncs), os quais possuem funções estruturais ou reguladoras. Apesar de a maioria dos distúrbios monogênicos conhecidos resultar de mutações que afetam a função de uma proteína, agora são conhecidas algumas exceções a essa generalização. Essas exceções são doenças que resultam de mutação em genes de RNAnc incluindo genes de microRNA (miRNA) que regulam genes-alvo específicos, e genes mitocondriais que codificam RNAs de transferência (RNAts; Cap. 12). É essencial entender as doenças genéticas nos níveis bioquímico e molecular, porque esse conhecimento é fundamental para a terapia racional. Neste capítulo, restringiremos nossa atenção às doenças resultantes de defeitos causados em genes codificantes de proteínas. O estudo do fenótipo no nível de proteínas, a bioquímica e o metabolismo constituem a disciplina da *genética bioquímica*.

Em 2014, uma versão *on-line* do *Mendelian Inheritance in Man* listou mais de 5.500 fenótipos para os quais se conhece a base molecular, a maioria deles com herança autossômica e ligada ao X. Apesar de ser impressionante que defeitos moleculares básicos tenham sido encontrados em tantos distúrbios, é preocupante saber que a fisiopatologia não é inteiramente conhecida para *nenhuma* doença genética. A *anemia falciforme* (Caso 42), discutida mais adiante neste capítulo, está entre os distúrbios hereditários mais

bem caracterizados, mas ainda assim o conhecimento está incompleto — apesar do fato de ter sido a primeira doença molecular a ser reconhecida, há mais de 65 anos.

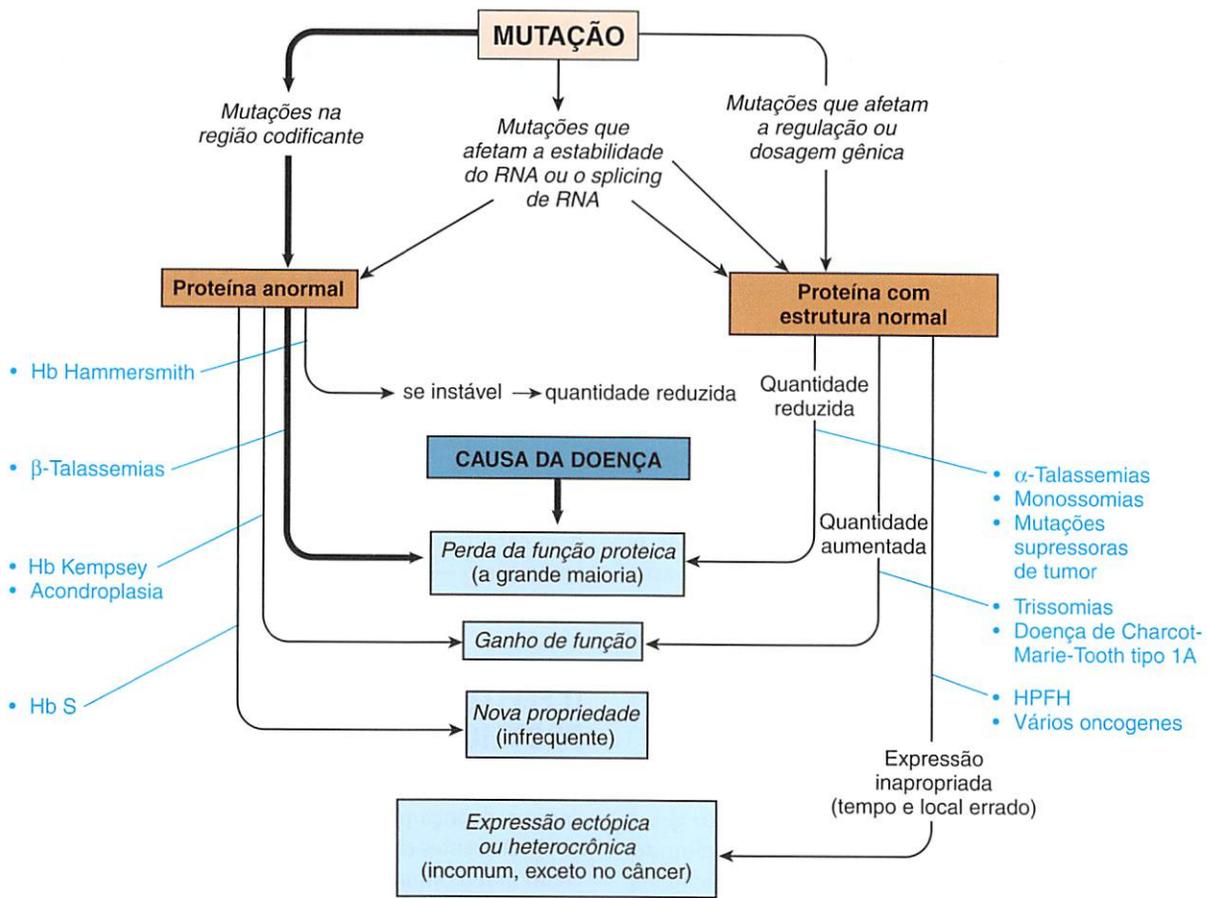
### O EFEITO DAS MUTAÇÕES SOBRE A FUNÇÃO PROTEICA

As mutações envolvendo genes codificantes de proteínas causam doença por meio de pelo menos um de quatro possíveis diferentes efeitos sobre a função proteica (Fig. 11-1). O efeito mais comum é a *perda de função* da proteína mutante. Muitas condições importantes surgem, no entanto, de outros mecanismos: um *ganho de função*, a aquisição de uma *nova propriedade* pela proteína mutante, ou a expressão de um gene no momento errado (*expressão heterocrônica*) e/ou no local errado (*expressão ectópica*).

### Mutações de Perda de Função

A perda de função de um gene pode resultar de uma alteração em sua sequência codificante, reguladora, ou de outras sequências críticas, devido a substituições, deleções, inserções ou rearranjos da sequência nucleotídica. Uma perda de função devido a uma deleção, levando a uma redução na dosagem gênica, é exemplificada pela  $\alpha$ -talassemia (Caso 44), que é comumente provocada pela deleção de genes de  $\alpha$ -globina (veja discussão a seguir); por doenças de perda cromossômica (Caso 27), como as monossomias, tais quais a *síndrome de Turner* (Cap. 6) (Caso 47); e por mutações somáticas adquiridas — frequentemente deleções — que ocorrem em genes supressores de tumor em muitos cânceres, como o *retinoblastoma* (Caso 39) (Cap. 15). Muitos outros tipos de mutação também podem levar a uma perda completa de função, e todos são ilustrados pela  $\beta$ -talassemia (Caso 44) (veja discussão a seguir), um grupo de hemoglobinopatias que resulta em uma redução na abundância de  $\beta$ -globina, uma das principais hemoglobinas nas hemácias dos adultos.

A severidade de uma doença resultante de mutações de perda de função geralmente está correlacionada com a quantidade da função perdida. Muitas vezes, mesmo



**Figura 11-1** Uma visão geral dos mecanismos pelos quais as mutações causadoras de doença produzem doença. As mutações em uma região codificante resulta em proteínas estruturalmente anormais que apresentam perda ou ganho de função, ou uma nova propriedade que resulta em doença. As mutações em sequências não codificantes são de dois tipos gerais: aquelas que alteram a estabilidade ou *splicing* do RNA mensageiro (RNAm) e aquelas que alteram elementos reguladores ou mudam a dosagem gênica. As mutações em elementos reguladores alteram a abundância do RNAm, ou o momento ou tipo celular no qual o gene é expresso. Tanto as mutações em região codificante, quanto aquelas que ocorrem em domínios reguladores podem reduzir a quantidade da proteína produzida. HPFH, Persistência hereditária da hemoglobina fetal.

uma pequena porcentagem de retenção de função residual pela proteína mutante reduz severamente a gravidade da doença.

## Mutações de Ganho de Função

As mutações também podem intensificar uma ou mais funções normais de uma proteína; entretanto, em um sistema biológico, mais não é necessariamente melhor, e uma doença pode ocorrer. É crítico reconhecer quando uma doença se deve a uma mutação de ganho de função, já que o tratamento deve ser necessariamente diferente daquele dos distúrbios resultantes de outros mecanismos, como as mutações de perda de função. As mutações de ganho de função pertencem a duas grandes classes:

- **Mutações que aumentam a produção de proteína normal.** Algumas mutações causam doença por aumentar a síntese de uma proteína normal nas células nas quais a proteína está normalmente presente. A mutação mais comum desse tipo resulta de um aumento da dosagem gênica,

o que geralmente é ocasionado pela duplicação de um cromossomo inteiro ou de parte dele. Como discutido no Capítulo 6, o exemplo clássico é a **trissomia do 21** (síndrome de Down), que se deve à presença de três cópias do cromossomo 21. Outras doenças importantes surgem do aumento da dosagem de genes únicos, incluindo uma forma da doença de Alzheimer familiar, resultante da duplicação do gene da proteína precursora de amiloide ( $\beta$ APP) (Cap. 12), e a degeneração do nervo periférico, **doença de Charcot-Marie-Tooth tipo 1A** (Caso 8), que geralmente resulta da duplicação de um único gene, o gene que codifica a proteína da mielina periférica 22 (*PMP22*).

- **Mutações que intensificam uma função normal de uma proteína.** Raramente uma mutação na região codificante aumenta a capacidade de a molécula de proteína executar uma ou mais das suas funções normais, mesmo que esse aumento seja determinante para todo o conjunto de funções fisiológicas desta proteína. Por exemplo, uma mutação *missense*, que cria a hemoglobina Kempsey, bloqueia a hemoglobina no seu estado de alta afinidade por oxigênio, reduzindo assim a distribuição de oxigênio para os tecidos.

Outro exemplo desse mecanismo ocorre em uma forma de baixa estatura chamada de **acondroplasia** (Caso 2).

## Mutações que Conferem Novas Propriedades

Em alguns casos, uma mudança na sequência de aminoácidos confere novas propriedades a uma proteína, sem necessariamente alterar suas funções normais. O exemplo clássico desse mecanismo é a **anemia falciforme** (Caso 42), a qual, como veremos mais adiante neste capítulo, deve-se à substituição de um aminoácido que **não** tem efeito sobre a capacidade de transporte de oxigênio da hemoglobina falciforme. Diferente e contrariamente à hemoglobina normal, as cadeias da hemoglobina falciforme se agregam quando estão desoxigenadas e formam fibras poliméricas anormais que deformam as hemácias. Não é de se surpreender que essas mutações que conferem novas propriedades sejam infrequentes, já que a maioria das substituições de aminoácidos ou é neutra ou é prejudicial para a função ou estabilidade das proteínas, as quais foram finamente reguladas pela evolução.

## Mutações Associadas com a Expressão Gênica Heterocrônica ou Ectópica

Uma classe importante de mutações inclui aquelas que levam a uma expressão inapropriada de um gene em um momento ou local anormais. Essas mutações ocorrem em regiões reguladoras do gene. Assim, o câncer é frequentemente resultado da expressão anormal de um gene que em geral promove a proliferação celular — um **oncogene** — em células nas quais este gene normalmente não é expresso (Cap. 15). Algumas mutações em elementos reguladores das hemoglobinas levam à expressão contínua do gene da  $\gamma$ -globina em adultos, que

é normalmente expressa em altos níveis na vida fetal. Essas mutações no gene da  $\gamma$ -globina causam um fenótipo benigno chamado de **persistência hereditária da hemoglobina fetal** (Hb F), como exploraremos a seguir neste capítulo.

## COMO AS MUTAÇÕES ALTERAM A FORMAÇÃO DE PROTEÍNAS BIOLÓGICAMENTE NORMAIS

As perturbações nas funções normais de uma proteína, que resultam dos vários tipos de mutações citados anteriormente, podem ser bem exemplificadas por várias doenças que se devem a mutações nos genes de globina, como exploraremos na segunda parte deste capítulo. Para formar uma proteína biologicamente ativa (como a molécula de hemoglobina), a informação deve ser transcrita da sequência nucleotídica de um gene para o RNAm, e então traduzida em um polipeptídeo, que passa por estágios progressivos de maturação (Cap. 3). As mutações podem interferir com qualquer um desses passos (Tabela 11-1). Como veremos posteriormente, cinco anormalidades nesses estágios serão ilustradas por várias hemoglobinopatias; as outras serão exemplificadas por doenças apresentadas no Capítulo 12.

## A RELAÇÃO ENTRE GENÓTIPO E FENÓTIPO NAS DOENÇAS GENÉTICAS

As variações no fenótipo clínico observado em uma doença hereditária podem ter uma de três explicações genéticas, a saber:

- Heterogeneidade alélica
- Heterogeneidade de *locus*, ou
- O efeito de genes modificadores

**TABELA 11-1** As Oito Etapas nas Quais as Mutações Podem Interromper a Produção de uma Proteína Normal

Etapa	Exemplo de Doença
Transcrição	Talasemias devido à produção reduzida ou ausência do RNAm de globina, devido a deleções ou mutações nos sítios reguladores e de <i>splicing</i> do RNAm do gene de globina
Tradução	Persistência hereditária da hemoglobina fetal, que resulta do aumento da transcrição pós-natal de um ou mais genes da $\gamma$ -globina
Dobramento do polipeptídeo	Talasemias devido a RNAs não funcionais ou com degradação rápida contendo mutações <i>nonsense</i> ou de mudança de matriz de leitura ( <i>frameshift</i> )
Modificação pós-traducional	Mais de 70 hemoglobinopatias se devem a hemoglobinas anormais com deleções ou substituições de aminoácidos que levam a globinas instáveis que são prematuramente degradadas (p. ex., Hb Hammersmith)
Montagem de monômeros em uma proteína holomérica	Doença de célula I, uma doença de armazenamento lisossômico que se deve a uma falha na adição de um grupo fosfato a resíduos de manose das enzimas lisossômicas. Os resíduos de manose 6-fosfato são necessários para direcionar as enzimas para os lisossomos (Cap. 12)
Localização subcelular do polipeptídeo ou do holômero	Tipos de osteogênese imperfeita nos quais uma substituição de aminoácido na cadeia de pró-colágeno prejudica a montagem normal da tripla-hélice do colágeno (Cap. 12)
Ligação de cofator ou grupo prostético ao polipeptídeo	Mutações de hipercolesterolemia familiar (classe 4), na extremidade carboxiterminal do receptor LDL, que prejudicam a localização do receptor em vesículas recobertas por clatrina, prevenindo a internalização do receptor e sua subsequente reciclagem para a superfície celular (Cap. 12)
Funcionamento de uma proteína corretamente enovelada, montada e localizada, produzida em quantidades normais	Tipos de homocisteinúria devido à falta ou à baixa ligação do cofator (piridoxal fosfato) à apoenzima cistationa sintase (Cap. 12)
	Doenças nas quais a proteína mutante é normal em quase todos os sentidos, exceto pelo fato de que uma de suas atividades biológicas críticas está alterada devido a uma substituição de aminoácido (p. ex., Hb Kempsey, onde há prejuízo de interação entre a subunidade que bloqueia a hemoglobina no seu estado de alta afinidade pelo oxigênio)

LDL, lipoproteína de baixa densidade; RNAm, RNA mensageiro.

TABELA 11-2 Tipos de Heterogeneidade Associadas a Doenças Genéticas

Tipo de Heterogeneidade	Definição	Exemplo
Heterogeneidade genética		
Heterogeneidade alélica	A ocorrência de um ou mais alelos em um <i>locus</i>	$\alpha$ -Talassemia $\beta$ -Talassemia
Heterogeneidade de <i>locus</i>	A associação de mais de um <i>locus</i> com um fenótipo clínico	A talassemia pode resultar de mutações tanto nos genes de $\alpha$ -globina quanto de $\beta$ -globina
Heterogeneidade clínica ou fenotípica	A associação de mais de um fenótipo com mutações de um único <i>locus</i>	A anemia falciforme e a $\beta$ -talassemia resultam de distintas mutações no gene da $\beta$ -globina

Cada umas dessas pode ser ilustrada por mutações nos genes da  $\alpha$ -globina e da  $\beta$ -globina (Tabela 11-2).

## Heterogeneidade Alélica

A heterogeneidade genética deve-se comumente à presença de alelos múltiplos em um único *locus*, uma situação chamada de heterogeneidade alélica (Cap. 7 e Tabela 11-1). Muitas vezes, há uma clara **correlação genótipo-fenótipo** entre um alelo específico e um fenótipo específico. A explicação mais comum para o efeito da heterogeneidade alélica no fenótipo clínico é que os alelos que conferem mais **função residual** na proteína mutante estão frequentemente associados com uma forma mais branda do principal fenótipo associado com a doença. Algumas vezes, entretanto, alelos que conferem alguma função proteica residual estão associados com apenas um ou um subconjunto do conjunto completo de fenótipos observados, quando há perda de um alelo ou este é completamente não funcional (frequentemente chamado de *alelo nulo*). Como exploraremos melhor no Capítulo 12, essa situação prevalece em certas variantes do gene da **fibrose cística**, o *CFTR*; estas variantes levam a uma condição fenotípica diferente, a **ausência congênita dos ductos deferentes**, mas não a outras manifestações da fibrose cística.

Uma segunda explicação para a variação fenotípica baseada em alelos é que a variação deve refletir uma propriedade específica da proteína que foi majoritariamente alterada pela mutação. Essa situação é bem ilustrada pela **Hb Kempsey**, um alelo da  $\beta$ -globina no qual a hemoglobina tem uma estrutura com alta afinidade pelo oxigênio, causando policitemia devido à distribuição periférica reduzida de oxigênio, que é interpretada de forma incorreta pelo sistema hematopoietico como uma produção inadequada de hemácias.

As consequências clínicas e bioquímicas de uma mutação específica em uma proteína são frequentemente imprevisíveis. Assim, ninguém poderia prever que o alelo da  $\beta$ -globina associado à anemia falciforme levaria à formação de polímeros de globina que deformam os eritrócitos para a morfologia celular de foice (veja a seguir neste capítulo). A anemia falciforme que resulta de uma **única** mutação específica — a substituição Glu6Val na cadeia da  $\beta$ -globina — é altamente incomum, enquanto a maioria dos fenótipos da doença surge de qualquer número ou de muitas substituições, normalmente mutações de perda de função na proteína afetada.

## Heterogeneidade de *Locus*

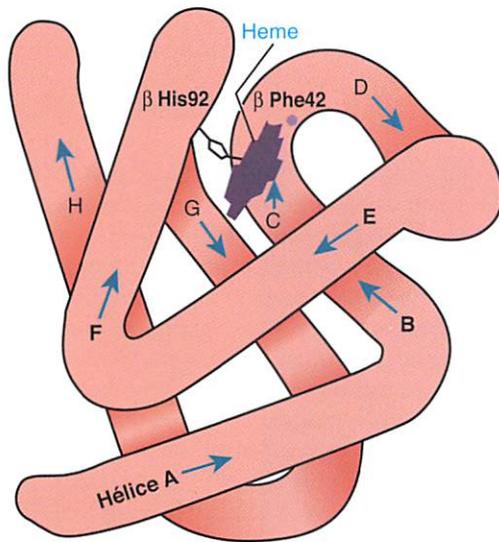
A heterogeneidade genética também surge quando mutações em mais de um *locus* podem resultar em condições clínicas específicas, uma situação chamada de **heterogeneidade de *locus*** (Cap. 7). Esse fenômeno é ilustrado pelo achado de que a talassemia pode resultar de mutações tanto na cadeia de  $\beta$ -globina quanto na de  $\alpha$ -globina (Tabela 11-2). Uma vez que a heterogeneidade de *locus* foi documentada, uma comparação cuidadosa do fenótipo associado a cada gene algumas vezes revela que o fenótipo não é tão homogêneo como se acreditava inicialmente.

## Genes Modificadores

Algumas vezes, mesmo as mais robustas relações genótipo-fenótipo não se enquadram em um paciente específico. Essa variação fenotípica pode, em princípio, ser devida a fatores ambientais ou à ação de outros genes, chamados de **genes modificadores** (Cap. 8). Até o momento, foram identificados apenas alguns genes modificadores para distúrbios monogênicos humanos, entretanto pode-se antecipar a existência de numerosos exemplos à medida que cresce o entendimento da base das doenças. Um exemplo, descrito posteriormente neste capítulo, pode ser visto nos homocigotos da  $\beta$ -talassemia (portadores de mutações no *locus* da  $\beta$ -globina) que também herdaram uma variante da  $\alpha$ -talassemia no *locus* da  $\alpha$ -globina.

## AS HEMOGLOBINAS

Para ilustrar em detalhes os conceitos introduzidos na primeira seção deste capítulo, olharemos agora os distúrbios humanos chamados de hemoglobinopatias — as doenças monogênicas mais comuns em humanos. Esses distúrbios causam morbidade substancial, e a Organização Mundial de Saúde estima que mais de 5% da população mundial é portadora de variantes genéticas clinicamente importantes de distúrbios da hemoglobina. Elas também são importantes porque sua patologia bioquímica e molecular é, talvez, a mais bem compreendida entre todo o grupo de doenças genéticas. Antes de discutirmos as hemoglobinopatias em detalhes é importante uma breve introdução sobre os aspectos normais dos genes de globina e a biologia da hemoglobina.



**Figura 11-2** A estrutura de uma subunidade de hemoglobina. Cada subunidade tem oito regiões helicoidais, designadas de A a H. Os dois aminoácidos mais conservados estão mostrados: His92, a histidina à qual o ferro do heme está covalentemente ligado; e Phe42, a fenilalanina que envolve o anel porfirina do heme no “bolso” do heme na proteína enovelada. Verifique a discussão da Hb Hammersmith e da Hb Hyde Park, que possuem substituições da Phe42 e His92, respectivamente, na molécula de  $\beta$ -globina.

## Estrutura e Função da Hemoglobina

A hemoglobina é a transportadora de oxigênio nas hemácias dos vertebrados. Cada molécula de hemoglobina consiste em quatro subunidades: duas cadeias de  $\alpha$ -globina e duas cadeias de  $\beta$ -globina (ou tipo  $\beta$ ). Cada subunidade é composta de uma cadeia polipeptídica, a globina, e um grupo prostético, o heme, que é um pigmento contendo ferro que se combina com o oxigênio para dar à molécula a capacidade de transportá-lo (Fig. 11-2). A hemoglobina predominante em humanos adultos, a Hb A, tem uma estrutura  $\alpha_2\beta_2$ , na qual as quatro cadeias são dobradas e ligadas para formar um tetrâmero globular.

Como ocorre em todas as proteínas que foram extensivamente conservadas durante a evolução, a *estrutura terciária* das globinas é constante; praticamente todas as globinas têm sete ou oito regiões helicoidais (dependendo da cadeia) (Fig. 11-2). Mutações que interferem na estrutura terciária invariavelmente têm consequências patológicas. Além disso, mutações que substituem um aminoácido altamente conservado ou que substituem um dos resíduos apolares, que formam a “concha” hidrofóbica responsável por excluir a água do interior da molécula, comumente causam uma hemoglobinopatia (Fig. 11-2). Como todas as proteínas, a globina tem áreas sensíveis, nas quais mutações não podem ocorrer sem afetar a função, e áreas insensíveis, nas quais as variações são mais livremente toleradas.

## Os Genes de Globina

Além da Hb A, com sua estrutura  $\alpha_2\beta_2$ , existem outras cinco hemoglobinas humanas normais, cada uma das quais possui uma estrutura tetramérica, como aquela da Hb A, consistindo em duas cadeias  $\alpha$  ou do tipo  $\alpha$  e duas cadeias não

$\alpha$  (Fig. 11-3A). Os genes para as cadeias  $\alpha$  e do tipo  $\alpha$  são reunidos em um arranjo em *tandem* no cromossomo 16. Note que existem dois genes de  $\alpha$ -globina *idênticos*, chamados  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , em cada homólogo. Os genes de  $\beta$ -globina e do tipo  $\beta$ , localizados no cromossomo 11, são membros de famílias relacionadas que, como descrito no Capítulo 13, surgiram indubitavelmente de um gene ancestral em comum (Fig. 11-3A). Ilustrando essa relação de proximidade evolucionária, a  $\beta$ - e a  $\delta$ -globina diferem em apenas 10 dos seus 146 aminoácidos.

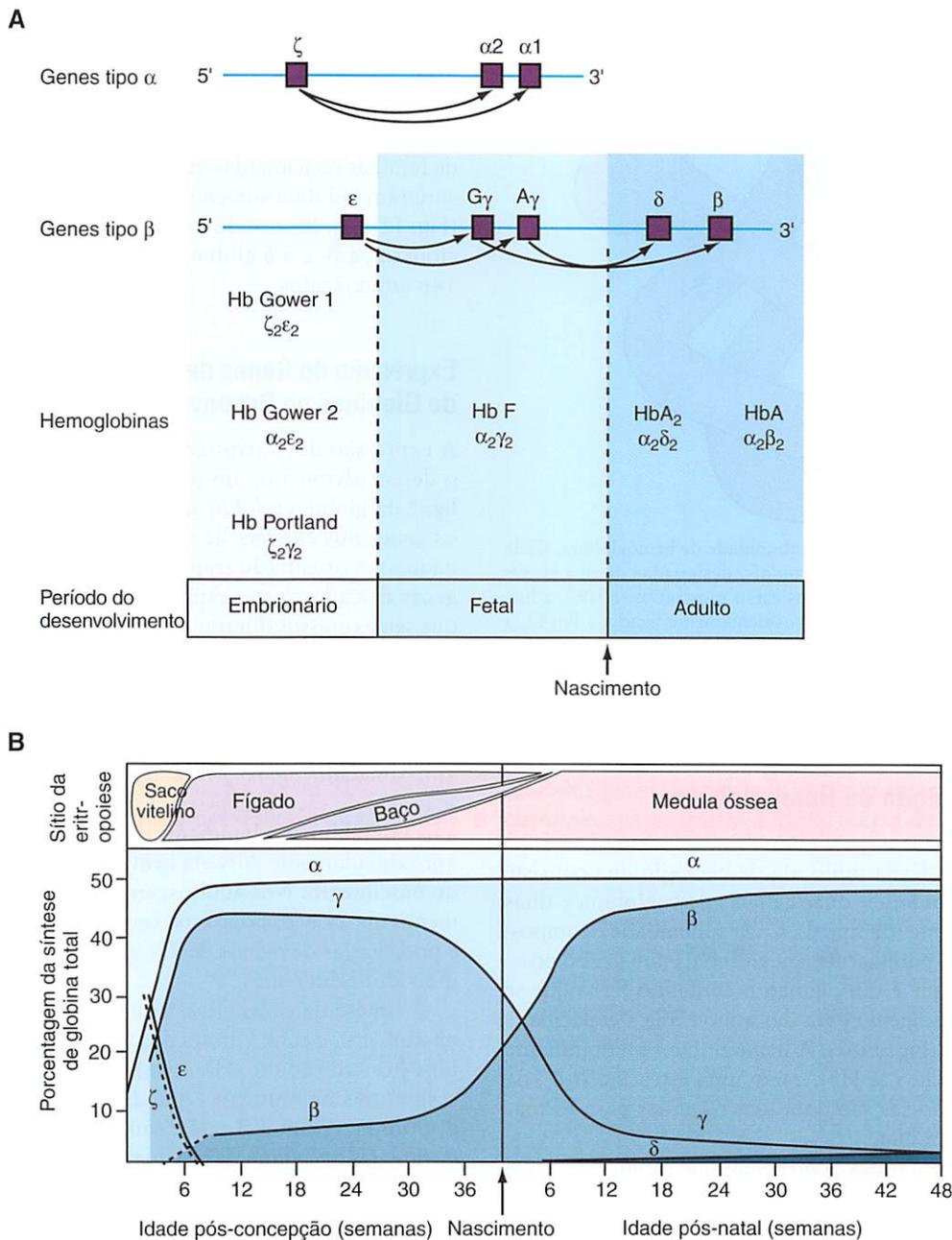
## Expressão de Genes de Globina e o “Liga e Desliga” de Globinas no Desenvolvimento

A expressão dos vários genes de globina se altera durante o desenvolvimento, um processo chamado de “liga e desliga” da globina (*globin switching*) (Fig. 11-3B). Note que os genes nos *clusters* de  $\alpha$ - e  $\beta$ -globinas estão arranjados na mesma orientação transcricional e, de forma notável, os genes de cada *cluster* estão situados na mesma ordem em que são expressos durante o desenvolvimento. As mudanças temporais da síntese de globina são acompanhadas por mudanças no principal sítio de eritropoiese (Fig. 11-3B). Assim, as três globinas embrionárias são produzidas no saco vitelino a partir da 3ª até a 8ª semana de gestação, mas aproximadamente na 15ª semana a hematopoiese começa a se mover do saco vitelino para o fígado fetal. A Hb F ( $\alpha_2\gamma_2$ ), a hemoglobina predominante durante a vida fetal, constitui aproximadamente 70% da hemoglobina total no momento do nascimento. Nos adultos, entretanto, a Hb F representa menos que poucos pontos percentuais da hemoglobina total, e pode variar de menos de 1% a aproximadamente 5% em indivíduos diferentes.

A síntese da cadeia  $\beta$  se torna significativa por volta do nascimento, e com 3 meses de idade quase toda a hemoglobina é do tipo adulto, Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ) (Fig. 11-3B). Em doenças resultantes de mutações que diminuem a abundância da  $\beta$ -globina, como a  $\beta$ -talassemia (veja a próxima seção), estratégias que aumentam a quantidade normalmente baixa de  $\gamma$ -globina produzida em adultos (e, consequentemente, de Hb F [ $\alpha_2\gamma_2$ ]) têm demonstrado sucesso em melhorar o distúrbio (Cap. 13).

## A Regulação da Expressão do Gene da $\beta$ -Globina durante o Desenvolvimento: A Região Controladora de Locus

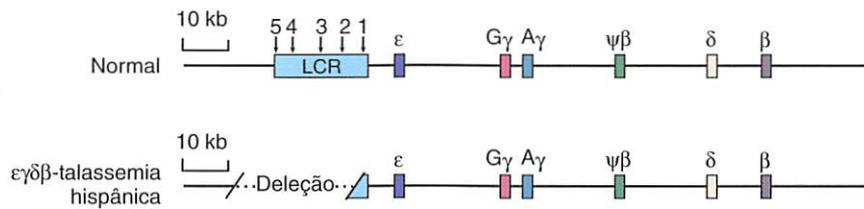
A elucidação dos mecanismos que controlam a expressão dos genes de globina tem contribuído para a compreensão sobre os processos normais e patológicos. A expressão do gene da  $\beta$ -globina é apenas parcialmente controlada pelo promotor e dois acentuadores localizados no DNA imediatamente flanqueadores ao gene (Cap. 3). Um requisito importante para reguladores adicionais foi inicialmente sugerido pela identificação de um grupo único de pacientes que não apresentava expressão gênica a partir de *qualquer* um dos genes do *cluster* de  $\beta$ -globina, mesmo quando estes genes estavam intactos (incluindo os elementos reguladores).



**Figura 11-3** Organização dos genes de globina humana e hemoglobinas produzidas em cada estágio do desenvolvimento humano. A, Os genes do tipo  $\alpha$  estão no cromossomo 16, os genes do tipo  $\beta$  estão no cromossomo 11. As setas curvas indicam as mudanças na expressão gênica durante o desenvolvimento. B, Desenvolvimento da eritropoiese no feto humano e na criança. Tipos de células responsáveis pela síntese de hemoglobina, órgãos envolvidos, e tipos de cadeia de globina sintetizados nos estágios sucessivos são mostrados. *Veja Fontes & Agradecimentos.*

Esses pacientes informativos apresentavam grandes deleções a montante do complexo  $\beta$ -globina, deleções que removeram um domínio de aproximadamente 20 kb, chamado de **região controladora do locus** (LCR), que começa aproximadamente 6 kb a montante do gene da  $\epsilon$ -globina (Fig. 11-4). Apesar de a doença resultante,  $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talassemia, ser descrita mais adiante neste capítulo, esses pacientes demonstraram que a LCR é necessária para a expressão de todos os genes do *cluster* da  $\beta$ -globina.

A LCR é definida por cinco sítios hipersensíveis à DNase I (Fig. 11-4), regiões genômicas que não estão comumente abertas a certas proteínas (como a enzima DNase I) e que são usadas experimentalmente para revelar sítios potencialmente reguladores. Dentro do contexto do empacotamento epigenético da cromatina (Cap. 3), esses sítios configuram um estado aberto da cromatina nesse *locus* nas células eritroides, cujo papel é manter uma configuração aberta no *locus*, configuração esta que permite o acesso de



**Figura 11-4** A região de controle de *locus* da  $\beta$ -globina (LCR). Cada uma das cinco regiões de cromatina aberta (*setas*) contém vários sítios de ligação consenso para fatores de transcrição eritroide-específicos e ubíquos. O mecanismo preciso pelo qual a LCR regula a expressão gênica é desconhecido. A deleção da LCR que resulta em  $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talassemia também é mostrada, a qual está discutida no texto. *Veja Fontes & Agradecimentos.*

fatores de transcrição a elementos reguladores que medeiam a expressão de cada um dos genes da  $\beta$ -globina (Cap. 3). ALCR, juntamente com suas proteínas associadas de ligação ao DNA, interage com genes do *locus* da  $\beta$ -globina para formar um domínio nuclear chamado de **centro de cromatina ativa**, onde a expressão do gene da  $\beta$ -globina ocorre. O “liga e desliga” sequencial da expressão gênica, que ocorre entre os cinco membros do complexo de genes da  $\beta$ -globina durante o desenvolvimento, resulta da associação sequencial do centro de cromatina ativa com diferentes genes no *cluster* à medida que o centro se move do gene mais proximal para o mais distal (genes de  $\delta$ - e  $\beta$ -globina em adultos).

Três situações estão associadas à significância clínica da LCR. Primeiramente, como mencionado, pacientes com deleções da LCR falham em expressar os genes do *cluster* de  $\beta$ -globina. Em segundo lugar, os componentes da LCR são provavelmente essenciais na terapia gênica (Cap. 13) para distúrbios do *cluster* da  $\beta$ -globina, já que uma cópia normal do gene em questão é expressa no momento correto da vida e no tecido apropriado. E em terceiro lugar, o conhecimento dos mecanismos moleculares que governam o “liga e desliga” de globinas pode permitir a indução do aumento da expressão do gene da  $\gamma$ -globina em pacientes com  $\beta$ -talassemia (que tenham mutações apenas no gene das  $\beta$ -globinas), já que a Hb F ( $\alpha_2\gamma_2$ ) é uma transportadora eficaz de oxigênio em adultos que não possuem a Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ) (Cap. 13).

## Dosagem Gênica, Expressão de Globinas no Desenvolvimento e Doença Clínica

As diferenças na dosagem gênica de  $\alpha$ - e  $\beta$ -globinas (quatro genes de  $\alpha$ -globina e dois de  $\beta$ -globina, por genoma diploide) e seus padrões de expressão durante o desenvolvimento são importantes para compreender a patogênese de muitas hemoglobinopatias. Mutações no gene da  $\beta$ -globina comumente causam mais doenças que mutações da cadeia  $\alpha$ , porque uma única mutação no gene da  $\beta$ -globina afeta 50% das cadeias  $\beta$ , enquanto uma única mutação no gene da cadeia  $\alpha$  afeta apenas 25% das cadeias  $\alpha$ . Por outro lado, as mutações em  $\beta$ -globina não têm consequências pré-natais, já que a  $\gamma$ -globina é a principal globina tipo  $\beta$  antes do nascimento, com a Hb F constituindo 75% da hemoglobina total à época do parto (Fig. 11-3B). Em contraste, como as cadeias  $\alpha$  são os únicos componentes tipo  $\alpha$  das hemoglobinas durante as 6 semanas após a concepção, as mutações de

$\alpha$ -globina causam doença severa tanto na vida fetal quanto na pós-natal.

## AS HEMOGLOBINOPATIAS

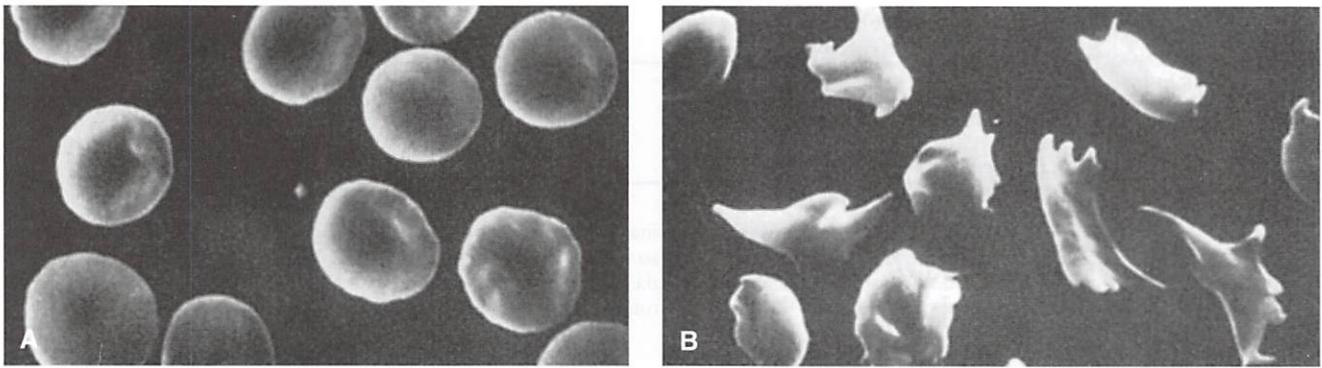
Os distúrbios hereditários da hemoglobina podem ser divididos em três grandes grupos, que em alguns casos se sobrepõem:

- **Variantes estruturais**, que alteram a sequência de aminoácidos do polipeptídeo globina, alterando propriedades como sua capacidade de transportar oxigênio ou reduzindo sua estabilidade. *Exemplo: Anemia falciforme (Caso 42)*, devido a uma mutação que torna a  $\beta$ -globina desoxigenada relativamente insolúvel, mudando a forma das hemácias (Fig. 11-5).
- **Talassemias**, que são doenças resultantes do decréscimo na abundância de uma ou mais cadeias de globina (Caso 44). O decréscimo pode resultar da produção reduzida de uma cadeia de globina ou, de maneira menos comum, de uma variante estrutural que desestabiliza a cadeia. O desequilíbrio resultante, na razão entre cadeias  $\alpha$ : $\beta$ , determina a fisiopatologia dessas condições. *Exemplo: Mutações no promotor que diminuem a expressão do RNAm da  $\beta$ -globina e causam a  $\beta$ -talassemia.*
- **Persistência hereditária da hemoglobina fetal** é um grupo de condições *clínicamente benignas* que impede a troca perinatal da síntese de  $\gamma$ -globina pela  $\beta$ -globina. *Exemplo: Uma deleção, encontrada em afro-americanos, que remove ambos os genes da  $\delta$ - e  $\beta$ -globina, mas leva à expressão pós-natal continuada dos genes de  $\gamma$ -globina, para produzir Hb F, que é uma transportadora efetiva de oxigênio (Fig. 11-3).*

## Variantes Estruturais da Hemoglobina

A maioria das hemoglobinas variantes resulta de mutações pontuais em um dos genes estruturais de globina. Mais de 400 mutações estruturais em hemoglobinas foram descritas, e aproximadamente metade destas são clinicamente significativas. As variantes estruturais da hemoglobina podem ser separadas nas três classes a seguir, dependendo do fenótipo clínico (Tabela 11-3):

- Variantes que causam **anemia hemolítica**, mais comumente porque tornam o tetrâmero de hemoglobina instável.
- Variantes com **transporte de oxigênio alterado**, devido ao aumento ou à diminuição da afinidade pelo oxigênio ou



**Figura 11-5** Micrografia eletrônica de varredura de hemácias de paciente com anemia falciforme. A, Células oxigenadas são arredondadas e cheias. B, A forma celular clássica de foice é produzida apenas quando as células estão no seu estado desoxigenado. *Veja Fontes & Agradecimentos.*

**TABELA 11-3** As Principais Classes de Variantes Estruturais da Hemoglobina

Classe Variante*	Substituição de Aminoácido	Efeito Fisiopatológico da Mutação	Herança
Hb S	Cadeia $\beta$ : Glu6Val	Hb S desoxigenada polimeriza $\rightarrow$ células falciformes $\rightarrow$ oclusão vascular e hemólise	AR
Hb Hammersmith	Cadeia $\beta$ : Phe42Ser	Hb instável $\rightarrow$ precipitação da Hb $\rightarrow$ hemólise; também baixa afinidade pelo oxigênio	AD
Hb Hyde Park (a Hb M)	Cadeia $\beta$ : His92Tyr	A substituição torna o ferro oxidado do heme resistente à meta-hemoglobina redutase $\rightarrow$ Hb M, não pode transportar oxigênio $\rightarrow$ cianose (assintomático)	AD
Hb Kempsey	Cadeia $\beta$ : Asp99Asn	A substituição mantém a Hb na estrutura de seu estado de alta afinidade pelo oxigênio $\rightarrow$ menos oxigênio para os tecidos $\rightarrow$ policitemia	AD
Hb E	Cadeia $\beta$ : Glu26Lys	A mutação $\rightarrow$ Hb anormal e com síntese diminuída ( <i>splicing</i> anormal do RNA) $\rightarrow$ talassemia branda <sup>†</sup> (Fig. 11-11)	AR

\*Variantes de hemoglobina são nomeadas após o nome da cidade do primeiro paciente descrito.

<sup>†</sup>Variantes estruturais adicionais de cadeia  $\beta$  que causam  $\beta$ -talassemia são mostradas na Tabela 11-5.

AD, autossômica dominante; AR, autossômica recessiva; Hb M, meta-hemoglobina; veja o texto.

à formação da meta-hemoglobina, uma forma incapaz de oxigenação reversível.

- Variantes que resultam de mutação na região codificante e causam talassemia porque reduzem a abundância do polipeptídeo globina. A maioria dessas mutações prejudica a taxa de síntese do RNAm ou afeta o nível da proteína codificada.

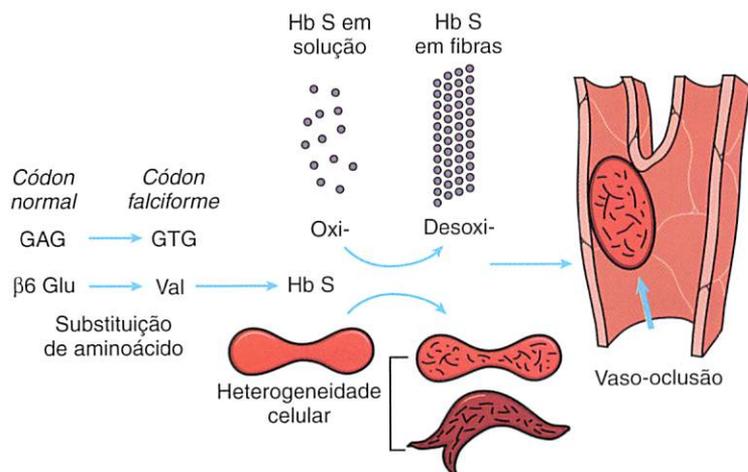
## Anemias Hemolíticas

**Hemoglobinas com Propriedades Físicas Novas: Anemia Falciforme.** A hemoglobina falciforme é de grande importância clínica em muitas partes do mundo. A doença resulta da substituição de um único nucleotídeo que muda o códon do sexto aminoácido da  $\beta$ -globina de ácido glutâmico para valina (GAG  $\rightarrow$  GTG; Glu6Val; Tabela 11-3). A homozigose para essa mutação é a causa da **anemia falciforme (Caso 42)**. A doença tem uma distribuição geográfica característica, ocorrendo mais frequentemente na África equatorial e, menos comumente, na área Mediterrânea e na Índia, e em países para os quais as pessoas dessas regiões migraram. Aproximadamente 1 em cada 600 afro-americanos nasce com a doença, que pode ser fatal na primeira infância, embora o aumento da sobrevivência esteja se tornando mais comum.

**Características Clínicas.** A anemia falciforme é uma condição hemolítica autossômica recessiva, caracterizada por uma tendência das hemácias a apresentar uma forma gros-

seiramente anormal (i.e., tem forma de foice) sob condições de baixa tensão de oxigênio (Fig. 11-5). Os heterozigotos, chamados de portadores do **traço falciforme**, são em geral clinicamente normais, mas suas hemácias podem mudar para forma de foice quando eles são submetidos à baixa pressão de oxigênio *in vitro*. Ocasões nas quais isto ocorre são incomuns, embora os homozigotos estejam sob risco de infarto esplênico, especialmente em grandes altitudes (p. ex., em aeronaves com pressão de cabine reduzida) ou quando exercem competições atléticas de níveis extremos. O estado heterozigoto está presente em aproximadamente 8% dos afro-americanos, mas em áreas onde a frequência do alelo falciforme ( $\beta^S$ ) é alta (p. ex., centro-oeste da África) mais de 25% da população recém-nascida é representada por heterozigotos.

A Patologia Molecular da Hb S. Há aproximadamente 60 anos, Ingram descobriu que a anormalidade da hemoglobina falciforme era uma substituição de um dos 146 aminoácidos da cadeia  $\beta$  da molécula de hemoglobina. Todas as manifestações clínicas da hemoglobina falciforme são consequência dessa única modificação no gene da  $\beta$ -globina. A descoberta de Ingram foi a primeira demonstração de que uma mutação em um gene estrutural *em qualquer organismo* pode causar uma substituição de aminoácido na proteína correspondente. Como a substituição é na cadeia da  $\beta$ -globina, a fórmula para a hemoglobina falciforme é escrita como  $\alpha_2\beta_2^S$  ou, mais precisamente,  $\alpha_2^A\beta_2^S$ . Um



**Figura 11-6** A patogênese da anemia falciforme. *Veja Fontes e Agradecimentos.*

heterozigoto tem uma mistura dos dois tipos de hemoglobina, A e S, resumida como  $\alpha_2^A\beta_2^A/\alpha_2^A\beta_2^S$ , assim como um tetrâmero híbrido de hemoglobina, escrito como  $\alpha_2^A\beta^A\beta^S$ . Fortes evidências indicam que a mutação falciforme surgiu no oeste da África, mas deve ter ocorrido de forma independente em outros lugares. O alelo  $\beta^S$  tem alta frequência em áreas do mundo onde há malária porque confere proteção contra esta doença em heterozigotos (Cap. 9).

**O Afoiçamento e suas Consequências.** A patologia molecular e celular da doença falciforme está sumarizada na Figura 11-6. Moléculas de hemoglobina contendo as unidades da  $\beta$ -hemoglobina mutante são normais na sua capacidade de executar sua função primária de ligação ao oxigênio (quando presentes, elas não polimerizam, como descrito a seguir), mas no sangue desoxigenado elas apresentam apenas um quinto da solubilidade, quando comparado à hemoglobina normal. Sob condições de baixa tensão de oxigênio, essa relativa insolubilidade da desoxi-hemoglobina S faz que as moléculas de hemoglobina falciforme se agreguem em polímeros, em forma de bastões ou fibras (Fig. 11-5). Esses bastões moleculares distorcem os eritrócitos  $\alpha_2\beta_2^S$  para a forma de foice, o que os impede de comprimirem-se em uma fileira única nos capilares, como ocorre com as hemácias normais, bloqueando assim o fluxo sanguíneo e causando isquemia local. Eles também podem causar o rompimento da membrana das hemácias (hemólise) e liberação de hemoglobina livre, que pode ter efeitos deletérios sobre a disponibilidade de vasodilatadores, como o óxido nítrico, exacerbando consequentemente a isquemia.

**Genes Modificadores Determinam a Severidade Clínica da Anemia Falciforme.** Há muito tempo sabe-se que um forte modificador da severidade clínica da doença falciforme é o nível de Hb F do paciente ( $\alpha_2\gamma_2$ ), sendo que altos níveis estão associados com menor morbidade e baixa mortalidade. A base fisiológica do efeito amenizador da Hb F é clara: a Hb F é uma transportadora perfeita de oxigênio na vida pós-natal e também inibe a polimerização da desoxi-hemoglobina S.

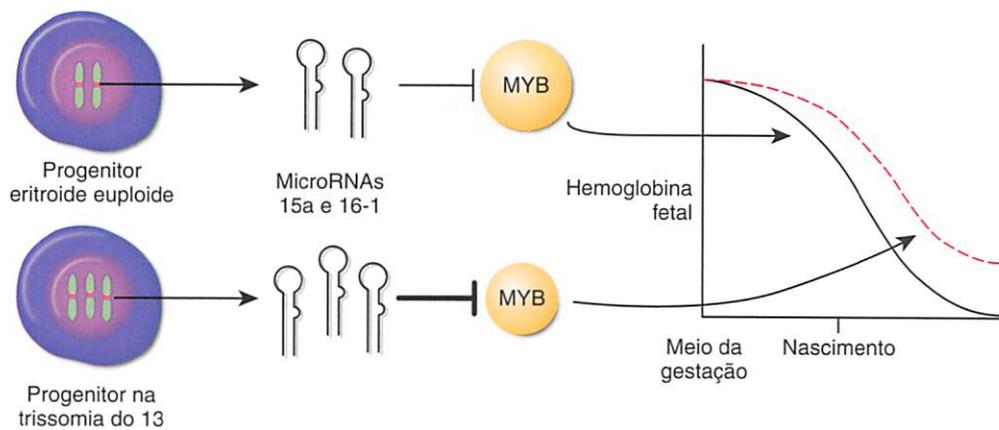
Até recentemente, entretanto, não se sabia se a variação na expressão da Hb F era hereditária. Estudos de associa-

ção genômica ampla (GWAS) (Cap. 10) demonstraram que polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em três *loci* — o gene da  $\gamma$ -globulina e dois genes que codificam fatores de transcrição, *BCL11A* e *MYB* — são responsáveis por 40% a 50% da variação nos níveis de Hb F nos pacientes com anemia falciforme. Além disso, os SNPs associados com Hb F estão também associados com episódios clínicos de dor em função da oclusão de capilares causada pelas hemácias falciformes (Fig. 11-6).

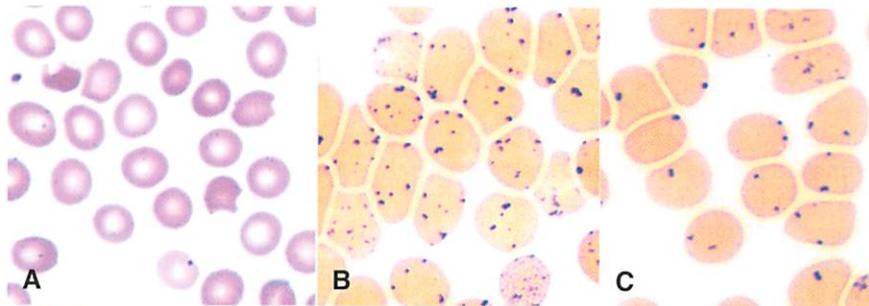
As variações genéticas no nível de Hb F também estão associadas com a severidade clínica na  $\beta$ -talassemia (discutida a seguir), visto que a abundância reduzida da  $\beta$ -globina (e, consequentemente, de Hb A [ $\alpha_2\beta_2$ ]) nessa doença é parcialmente aliviada por altos níveis de  $\gamma$ -globina e, assim, de Hb F ( $\alpha_2\gamma_2$ ). A descoberta desses modificadores genéticos da abundância de Hb F explica não apenas muito sobre a variação na severidade clínica da anemia falciforme e  $\beta$ -talassemia, mas também ressalta um princípio geral introduzido no Capítulo 8: *genes modificadores podem exercer papéis importantes na determinação da severidade clínica e fisiológica de distúrbios monogênicos.*

***BCL11A*, um Silenciador da Expressão do Gene da  $\gamma$ -Globulina em Células Eritroides Adultas.** A identificação de modificadores genéticos dos níveis de Hb F, particularmente o *BCL11A*, tem grande potencial terapêutico. O produto do gene *BCL11A* é um fator de transcrição que normalmente silencia a expressão da  $\gamma$ -globina, reprimindo a produção pós-natal de Hb F. Sendo assim, fármacos capazes de suprimir a atividade de *BCL11A* após o nascimento, consequentemente aumentando a expressão de Hb F, podem ser de grande benefício para pacientes com anemia falciforme e  $\beta$ -talassemia (Cap. 13), distúrbios estes que afetam milhões de indivíduos no mundo. Programas de triagem de pequenas moléculas para identificar fármacos potenciais desse tipo estão em andamento em muitos laboratórios.

**Trissomia do 13, MicroRNAs e *MYB*, Outro Silenciador da Expressão do Gene da  $\gamma$ -Globulina.** A indicação, pelo GWAS, de que o *MYB* é um importante regulador da expressão de  $\gamma$ -globina recebeu suporte de uma direção inesperada, estudos investigando a base da persis-



**Figura 11-7** Um modelo demonstrando como o aumento dos microRNAs 15a e 16-1 na trissomia do 13 pode resultar em expressão elevada de hemoglobina fetal. Normalmente, o nível basal desses microRNAs pode moderar a expressão de alvos como o gene *MYB* durante a eritropoiese. No caso da trissomia do 13, níveis elevados destes microRNAs resultam em sub-regulação (*down-regulation*) adicional da expressão de *MYB*, que consequentemente resulta em atraso na troca de hemoglobina fetal pela adulta e expressão persistente da hemoglobina fetal. *Veja Fontes & Agradecimentos.*



**Figura 11-8** Visualização de um efeito patológico da deficiência de cadeias  $\beta$  na  $\beta$ -talassemia: a precipitação do excesso de cadeias  $\alpha$  normais para formar o corpo de Heinz nas hemácias. A-C, O esfregaço de sangue periférico (A) mostra células “mordidas” com áreas semicirculares da membrana, correspondentes aos corpos de Heinz, removidas por macrófagos do baço, causando destruição prematura da hemácia. A preparação do corpo de Heinz (B) mostra corpos de Heinz aumentados no mesmo espécime quando comparado ao controle (C). *Veja Fontes & Agradecimentos.*

tência da expressão aumentada de Hb F pós-natal em pacientes com trissomia do 13 (Cap. 6). Dois miRNAs, miR-15a e miR-16-1, tem como alvo direto a região 3' não traduzida (UTR) do RNAm de *MYB*, reduzindo assim a expressão de *MYB*. Os genes para esses dois miRNAs estão localizados no cromossomo 13; prevê-se que sua dosagem extra na trissomia do 13 reduz a expressão de *MYB* abaixo dos níveis normais, e assim, em parte, diminui a repressão pós-natal da expressão do gene da  $\gamma$ -globina, normalmente mediada pela proteína *MYB*, resultando em expressão aumentada de Hb F (Fig. 11-7).

**Hemoglobinas Instáveis.** As hemoglobinas instáveis resultam em grande parte de mutações pontuais que causam a desnaturação do tetrâmero de hemoglobina em hemácias maduras. Os tetrâmeros de hemoglobina desnaturados são insolúveis e precipitam-se formando inclusões (corpos de Heinz) que contribuem para danificar a membrana das

hemácias, causando hemólise das hemácias maduras na árvore vascular (Fig. 11-8, mostrando o corpo de Heinz resultante da  $\beta$ -talassemia).

A substituição de um aminoácido na hemoglobina instável **Hb Hammersmith** (cadeia  $\beta$  Phe42Ser; Tabela 11-3) leva à desnaturação do tetrâmero e, consequentemente, à hemólise. Essa mutação é particularmente notável, já que o resíduo de fenilalanina substituído é um dos dois aminoácidos que são conservados em todas as globinas encontradas na natureza (Fig. 11-2). Assim, não é surpreendente que substituições dessa fenilalanina produzam doença grave. Na  $\beta$ -globina normal, a fenilalanina, que é um aminoácido volumoso, segura o grupo heme em um “bolso” dentro no monômero enovelado da  $\beta$ -globina. A substituição desse aminoácido por serina, um resíduo pequeno, cria um espaço que permite que o heme escape do seu bolso. Além da sua instabilidade, a Hb Hammersmith tem baixa afinidade por oxigênio, causando cianose em heterozigotos.

Ao contrário das mutações que desestabilizam o *tetrâmero*, outras variantes desestabilizam o *monômero* de globina e nunca formam o tetrâmero, causando desequilíbrio e talassemia (veja a seção seguinte).

### Variantes com Transporte de Oxigênio Alterado

Mutações que alteram a capacidade da hemoglobina de transportar oxigênio, apesar de raras, são de interesse geral, visto que ilustram como uma mutação pode impedir uma função proteica (neste caso, a ligação e liberação do oxigênio) e ainda deixam outras propriedades proteicas intactas. Por exemplo, as mutações que afetam o transporte de oxigênio geralmente têm pouco ou nenhum efeito sobre a estabilidade da hemoglobina.

**Meta-hemoglobinas.** A oxiemoglobina é a forma de hemoglobina com capacidade de oxigenação reversível; o ferro do heme está no seu estado reduzido (ou ferroso). O ferro do heme tende a se oxidar espontaneamente à forma férrica, e a molécula resultante, chamada de meta-hemoglobina, é incapaz de oxigenação reversível. Se quantidades significativas de meta-hemoglobina se acumularem no sangue, o resultado é a cianose. A manutenção do ferro no seu estado reduzido é papel da enzima meta-hemoglobina redutase. Em muitas globinas mutantes (tanto  $\alpha$ , quanto  $\beta$ ), substituições na região do bolso do heme afetam a ligação globina-heme de uma maneira que torna o ferro resistente à ação da redutase. Apesar de heterozigotos para essas hemoglobinas mutantes serem cianóticos, eles são assintomáticos. Presume-se que o estado homozigoto seja letal. Um exemplo de meta-hemoglobina de cadeia  $-\beta$  é a Hb Hyde Park (Tabela 11-3), na qual uma histidina conservada (His192 na Fig. 11-2) ligada covalentemente ao heme é substituída por uma tirosina (His92Tyr).

**Hemoglobinas com Afinidade Alterada pelo Oxigênio.** Mutações que alteram a afinidade pelo oxigênio demonstram a importância da interação entre subunidades para o funcionamento de proteínas multiméricas, como a hemoglobina. No tetrâmero de Hb A, a interface  $\alpha:\beta$  foi altamente conservada durante a evolução, pois é submetida à movimentação significativa entre as cadeias quando a molécula de hemoglobina passa de seu estado oxigenado (relaxado) para o estado desoxigenado (tenso). Substituições nos resíduos dessa interface, exemplificadas pela hemoglobina mutante Hb Kempsey (Tabela 11-3), impedem o movimento entre as cadeias relacionado à oxigenação; a mutação “bloqueia” a hemoglobina no seu estado de alta afinidade pelo oxigênio, reduzindo assim a distribuição de oxigênio para os tecidos e causando policitemia.

### Talassemias: Um Desequilíbrio na Síntese de Cadeias de Globina

As talassemias (do grego, *thalassa*, mar, e *haema*, sangue) são coletivamente os distúrbios monogênicos humanos

mais comuns no mundo (Caso 44). Elas são um grupo heterogêneo de doenças da síntese de hemoglobina, nas quais as mutações reduzem a síntese ou estabilidade da cadeia de  $\alpha$ -globina ou de  $\beta$ -globina, causando  $\alpha$ -talassemia ou  $\beta$ -talassemia, respectivamente. O desequilíbrio na razão de cadeias  $\alpha:\beta$  é a base da fisiopatologia. A cadeia que é produzida a uma taxa normal fica em relativo excesso; na ausência de uma cadeia complementar com a qual deveria formar um tetrâmero, o excesso de cadeias normais eventualmente precipita na célula, danificando a membrana e levando à destruição das hemácias. O excesso de cadeias  $\beta$ , ou do tipo  $\beta$ , é insolúvel e precipita tanto nos precursores de hemácias (causando uma eritropoiese ineficaz), quanto nas hemácias maduras (causando hemólise, pois danificam a membrana celular). O resultado é a perda de hemácias (anemia), nas quais as essas células são tanto hipocrômicas (i.e., células vermelhas pálidas) quanto microcíticas (i.e., hemácias pequenas).

O nome *talassemia* foi usado inicialmente para mostrar que a doença foi descoberta em pessoas originárias do Mediterrâneo. Entretanto ambas,  $\alpha$ -talassemia e  $\beta$ -talassemia, têm alta frequência em muitas populações, apesar de a  $\alpha$ -talassemia ser mais prevalente e mais amplamente distribuída. A alta frequência da talassemia deve-se à vantagem protetora contra a malária que ela confere aos portadores, análoga à vantagem do heterozigoto nos portadores da hemoglobina falciforme (Cap. 9). Existe uma distribuição característica das talassemias em um faixa ao redor do Velho Mundo — no Mediterrâneo, Oriente Médio e partes da África, Índia e Ásia.

Uma consideração clínica importante é que os alelos para ambos os tipos de talassemia, assim como nas anormalidades estruturais da hemoglobina, não incomumente coexistem em um mesmo indivíduo. Como resultado, interações clinicamente importantes podem ocorrer entre diferentes alelos do mesmo gene de globina ou entre alelos mutantes de diferentes genes de globina.

### As $\alpha$ -Talassemias

Os distúrbios genéticos de produção de  $\alpha$ -globina alteram a formação das hemoglobinas fetal e adulta (Fig. 11-3) e, conseqüentemente, causam doenças intrauterinas e pós-natais. Na ausência de cadeias de  $\alpha$ -globina com as quais podem se associar, as cadeias do *cluster* de  $\beta$ -globina ficam livres para formar uma hemoglobina homotetramérica. A hemoglobina com a composição  $\gamma_4$  é chamada de Hb de Bart, e o tetrâmero de  $\beta_4$  é chamado de Hb H. Já que em condições normais nenhuma dessas hemoglobinas é capaz de liberar oxigênio nos tecidos, elas são completamente ineficazes como transportadoras dessa molécula. Conseqüentemente, recém-nascidos com  $\alpha$ -talassemia severa e altos níveis de Hb de Bart ( $\gamma_4$ ) sofrem de hipoxia intrauterina severa e nascem com acúmulo disseminado de fluidos, uma condição conhecida como **hidropsia fetal**. Nas  $\alpha$ -talassemias mais brandas, uma anemia se desenvolve em função da precipitação gradual de Hb H ( $\beta_4$ ) no eritrócito. A formação de inclusões de

Hb H em hemácias maduras e a remoção dessas inclusões pelo baço danificam as células, levando à sua destruição prematura.

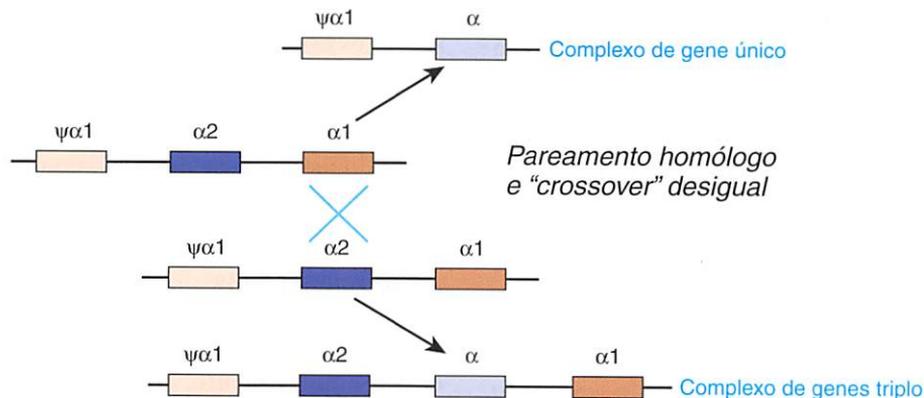
**Deleções em Genes de  $\alpha$ -Globina.** As formas mais comuns de  $\alpha$ -talassemia são resultado de deleções gênicas. A alta frequência de deleções em mutantes da cadeia  $\alpha$ , e não da cadeia  $\beta$ , deve-se à presença de dois genes idênticos de  $\alpha$ -globina em cada cromossomo 16 (Fig. 11-3A); as seqüências intrônicas dos dois genes da  $\alpha$ -globina também são similares. Esse arranjo em *tandem* de genes homólogos de  $\alpha$ -globina facilita o alinhamento incorreto durante o pareamento de homólogos e a subsequente recombinação entre o domínio gênico  $\alpha 1$  de um cromossomo com a região gênica  $\alpha 2$  correspondente do outro cromossomo (Fig. 11-9). Evidências que suportam esse mecanismo patogênico foram fornecidas por relatos de indivíduos normais raros com o complexo gênico de  $\alpha$ -globina triplicado. Deleções e outras alterações de uma, duas, três ou todas as quatro cópias dos genes de  $\alpha$ -globina causam anormalidades hematológicas proporcionalmente severas (Tabela 11-4).

O traço de  $\alpha$ -talassemia, causado pela deleção de dois dos quatro genes de  $\alpha$ -globinas, está distribuído ao redor do mundo. Entretanto, o tipo de deleção em homozigose da  $\alpha$ -talassemia, envolvendo as quatro cópias da  $\alpha$ -globina, que leva à Hb Bart ( $\gamma_4$ ) e à hidropsia fetal, está bastante restrito ao sudeste da Ásia. Nessas populações, a alta frequência de hidropsia fetal devido à  $\alpha$ -talassemia pode ser expli-

cada pela natureza da deleção causadora. Indivíduos com duas  $\alpha$ -globinas normais e duas mutadas são chamados portadores do traço da  $\alpha$ -talassemia, que resulta em um de dois fenótipos prováveis ( $-/\alpha\alpha$  ou  $-\alpha/-\alpha$ ), dependendo de se a deleção está ou não em *cis* ou em *trans*. A heterozigose para a deleção de ambas as cópias do gene da  $\alpha$ -globina em *cis* (genótipo  $-/\alpha\alpha$ ) é relativamente comum no sudeste da Ásia, e a prole de dois portadores de alelos dessa deleção pode, conseqüentemente, receber dois cromossomos  $-/-$ . Em outros grupos, entretanto, o traço de  $\alpha$ -talassemia é normalmente resultado do genótipo  $-\alpha/-\alpha$  em *trans*, que pode não originar uma prole  $-/-$ .

Além das mutações da  $\alpha$ -talassemia que resultam em deleção de genes da  $\alpha$ -globina, mutações que deletam apenas a LCR do complexo de  $\alpha$ -globina também causam  $\alpha$ -talassemia. Na verdade, de forma similar às observações discutidas anteriormente a respeito da LCR da  $\beta$ -globina, esse tipo de deleção é crítica para demonstrar a existência desse elemento regulador no *locus* da  $\alpha$ -globina.

**Outras Formas de  $\alpha$ -Talassemia.** Em todos os casos de  $\alpha$ -talassemia descritos previamente, deleções nos genes de  $\alpha$ -globina ou mutações nas suas seqüências que atuam em *cis* levam à redução da síntese de  $\alpha$ -globina. Outros tipos de  $\alpha$ -talassemia ocorrem muito menos comumente. Uma forma importante e rara de  $\alpha$ -talassemia é a **síndrome ATR-X**, que está associada com a  $\alpha$ -talassemia e deficiência intelectual, e ilustra a importância do empacotamento epigenético do genoma na regulação da expressão gênica



**Figura 11-9** O mecanismo provável que determina a forma mais comum de  $\alpha$ -talassemia, a qual se deve à deleção de um dos dois genes de  $\alpha$ -globina no cromossomo 16. Alinhamento incorreto, pareamento homólogo, e recombinação entre o gene  $\alpha 1$  em um cromossomo e o gene  $\alpha 2$  no cromossomo homólogo resultam na deleção de um gene da  $\alpha$ -globina.

**TABELA 11-4** Estados Clínicos Associados aos Genótipos de  $\alpha$ -Talassemia

Condição Clínica	Número de Genes $\alpha$ Funcionais	Genótipo do Gene da $\alpha$ -Globina	Produção de Cadeia $\alpha$
Normal	4	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	100%
Portador silencioso	3	$\alpha\alpha/\alpha-$	75%
Traço de $\alpha$ -Talassemia (anemia branda, microcitose)	2	$\alpha-/\alpha-$ ou $\alpha\alpha/--$	50%
Doença da Hb H ( $\beta_4$ ) (anemia hemolítica moderadamente severa)	1	$\alpha-/--$	25%
Hidropsia fetal ou $\alpha$ -talassemia homozigótica (Hb Bart's: $\gamma_4$ )	0	$--/--$	0%

(Cap. 3). O gene *ATRX* ligado ao X codifica uma proteína remodeladora de cromatina que funciona em *trans*, para ativar a expressão dos genes de  $\alpha$ -globina. A proteína *ATRX* pertence à família de proteínas que funcionam dentro de grandes complexos multiproteicos que alteram a topologia do DNA. A síndrome ATR-X é umas das crescentes doenças monogênicas que resultam de mutações em proteínas remodeladoras de cromatina.

A síndrome ATR-X foi inicialmente reconhecida como incomum, já que as primeiras famílias nas quais foi identificada foram de norte-europeus, uma população na qual as formas de deleção de  $\alpha$ -talassemia são incomuns. Além disso, os indivíduos afetados eram homens que também possuíam deficiência intelectual ligada ao X severa, juntamente com uma ampla gama de outras anormalidades, como características faciais particulares, defeitos esqueléticos e malformações urogenitais. Essa diversidade de fenótipos sugere que a *ATRX* regula a expressão de numerosos outros genes além das  $\alpha$ -globinas, apesar desses outros alvos serem desconhecidos até o momento.

Em pacientes com a síndrome ATR-X, a redução da síntese de  $\alpha$ -globina deve-se ao crescente acúmulo de uma variante de histona, chamada de macroH2A, no *cluster* gênico da  $\alpha$ -globina (Cap. 3), um acúmulo que reduz a expressão do gene da  $\alpha$ -globina e causa  $\alpha$ -talassemia. Todas as mutações identificadas até o momento, no gene *ATRX* da síndrome ATR-X, são mutações de perda de função parcial, que resultam em defeitos hematológicos moderados quando comparados àqueles observados nas formas clássicas de  $\alpha$ -talassemia.

Em pacientes com a síndrome ATR-X, anormalidades nos padrões de metilação do DNA indicam que a proteína *ATRX* é também necessária para estabelecer e manter o padrão de metilação de certos domínios do genoma, talvez pela modulação do acesso da enzima DNA metiltransferase aos seus sítios de ligação. Este achado é muito importante, já que mutações em outro gene, o *MECP2*, que codifica a proteína que se liga ao DNA metilado, causam a *síndrome de Rett* (Caso 40), pela alteração da regulação epigenética de genes em regiões do DNA metilado, levando à regressão do neurodesenvolvimento. Normalmente, as proteínas *ATRX* e *MeCP2* interagem, e o prejuízo dessa interação, devido a mutações no *ATRX*, pode contribuir para a deficiência intelectual observada na síndrome ATR-X.

## As $\beta$ -Talassemias

As  $\beta$ -talassemias compartilham muitas características com a  $\alpha$ -talassemia. Na  $\beta$ -talassemia, o decréscimo na produção de  $\beta$ -globina causa anemia hipocrômica, microcítica e desequilíbrio da síntese de globina, devido ao excesso de cadeias  $\alpha$ . As cadeias  $\alpha$  em excesso são insolúveis e precipitam (Fig. 11-8) tanto nas células precursoras dos eritrócitos (causando eritropoiese ineficaz), como nas hemácias maduras (causando hemólise), já que elas danificam a membrana celular. De modo diferente da  $\alpha$ -globina, entretanto, a cadeia  $\beta$  é importante apenas no período pós-natal. Consequentemente, o surgimento da  $\beta$ -talassemia não é aparente até poucos meses após o nascimento, quando a  $\beta$ -globina normalmente substitui a  $\gamma$ -globina como a

principal cadeia não  $\alpha$  (Fig. 11-3B), e apenas a síntese da principal hemoglobina do adulto, a Hb A, é reduzida. O nível de Hb F está aumentado na  $\beta$ -talassemia não por causa da reativação da expressão do gene de  $\gamma$ -globina que foi desligada ao nascimento, mas sim por causa da sobrevivência seletiva e talvez também devido à produção aumentada de uma população minoritária de hemácias do adulto, contendo Hb F.

Em contraste com a  $\alpha$ -talassemia, as  $\beta$ -talassemias são normalmente resultado da substituições de um único par de bases e não de deleções (Tabela 11-5). Em muitas regiões do mundo onde a  $\beta$ -talassemia é comum, existem muitas mutações distintas de  $\beta$ -talassemia, nas quais as pessoas carregando dois alelos de  $\beta$ -talassemia são mais provavelmente **compostos genéticos** (i.e., carregam dois alelos diferentes para a  $\beta$ -talassemia) do que homocigotos verdadeiros para um alelo. A maioria dos indivíduos com dois alelos da  $\beta$ -talassemia tem a **talassemia maior**, uma condição caracterizada por anemia severa e necessidade de cuidados médicos por toda a vida. Quando os alelos da  $\beta$ -talassemia permitem uma produção quase nula de  $\beta$ -globina, resultando em ausência de Hb A, a condição é chamada de  $\beta^0$ -talassemia. Se alguma Hb A é detectável, o paciente tem  $\beta^+$ -talassemia. Apesar de a severidade da doença clínica depender do efeito combinado dos dois alelos presentes, a sobrevivência até a vida adulta era, até recentemente, incomum.

Crianças homocigotas para a  $\beta$ -talassemia apresentam anemia logo que a produção pós-natal de Hb F diminui, geralmente antes dos 2 anos de idade. Até o momento, o tratamento das  $\beta$ -talassemias baseia-se na correção da anemia e na expansão da medula por meio de transfusões sanguíneas, e pelo controle do conseqüente acúmulo de ferro com a administração de agentes quelantes. O transplante de medula óssea é eficaz, mas é uma opção disponível somente se um membro da família HLA compatível for encontrado.

Os portadores de um alelo de  $\beta$ -talassemia são clinicamente normais e diz-se que eles têm **talassemia menor**. Esses indivíduos têm hemácias hipocrômicas, microcíticas, e podem ter anemia leve, que pode ser erroneamente diagnosticada no início como deficiência de ferro. O diagnóstico da talassemia menor pode ser determinado pela eletroforese de hemoglobinas, que geralmente revela um aumento no nível de Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) (Fig. 11-3A). Em muitos países, heterocigotos para talassemia são tão numerosos que exigem diagnóstico diferencial para anemia resultante da deficiência de ferro, e são fonte comum de referência para o diagnóstico pré-natal de fetos homocigotos afetados (Cap. 17).

**Alelos da  $\alpha$  – Talassemia como Genes Modificadores da  $\beta$ -Talassemia.** Um dos melhores exemplos de um gene modificador na genética humana surge do fato de que ambos os alelos da  $\alpha$ -talassemia e da  $\beta$ -talassemia podem estar presentes em uma mesma população. Nessas populações, homocigotos da  $\beta$ -talassemia podem herdar também um alelo da  $\alpha$ -talassemia. A severidade clínica da  $\beta$ -talassemia é algumas vezes atenuada pela presença do alelo da  $\alpha$ -talassemia, que age como um gene modificador: o desequilíbrio

TABELA 11-5 A Base Molecular de Algumas Causas de  $\beta$ -Talassemia Simples

Tipo	Exemplo	Fenótipo	População Afetada
<b>Síntese de RNAm Defeituosa</b>			
Defeitos no <i>splicing</i> de RNA (Fig. 11-11C)	Sítio aceptor anormal no intron 1: AG → GG	$\beta^0$	Negros
Mutantes de promotor	Mutação no TATA <i>box</i> -31 -30 -29 -28 -31 -30 -29 -28 A T A A → G T A A	$\beta^+$	Japoneses
Sítio de <i>cap</i> do RNA anormal	Transversão de A → C no sítio de <i>cap</i> do RNAm	$\beta^+$	Asiáticos
Defeitos no sinal de poliadenilação	AATAAA → AACAAA	$\beta^+$	Negros
<b>RNAm Não Funcionais</b>			
Mutações sem sentido ( <i>nonsense</i> )	Códon 39 Gln → término CAG → UAG	$\beta^0$	Mediterrâneos (especialmente na Sardenha)
Mutações de mudança na matriz de leitura ( <i>frameshift</i> )	Códon 16 (deleção de 1 pb) Normal trp gly lys val asn 15 16 17 18 19 UGG GGC AAG GUG AAC UUG GCA AGG UGA Mutante trp ala arg término	$\beta^0$	Indianos
<b>Mutações em Região Codificante que também Alteram o <i>Splicing</i>*</b>			
Mutações sinônimas	Códon 24 gly → gly GGU → GGA	$\beta^+$	Negros

\*Uma outra hemoglobina variante estrutural que causa  $\beta$ -talassemia é mostrada na Tabela 11-3. RNAm, RNA mensageiro.

Derivada parcialmente de Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR, Wood WG: The hemoglobinopathies. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, ed 7, New York, 1995, McGraw-Hill, pp 3417-3484; and Orkin SH: Disorders of hemoglobin synthesis: the thalassemias. In Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Leder P, Majerus PW, editors: *The molecular basis of blood diseases*, Philadelphia, 1987, WB Saunders, pp 106-126.

na síntese da cadeia de globina que ocorre na  $\beta$ -talassemia, devido ao excesso relativo de cadeias  $\alpha$ , é reduzido pelo decréscimo na produção de cadeias  $\alpha$ , que resulta de mutação da  $\alpha$ -talassemia.

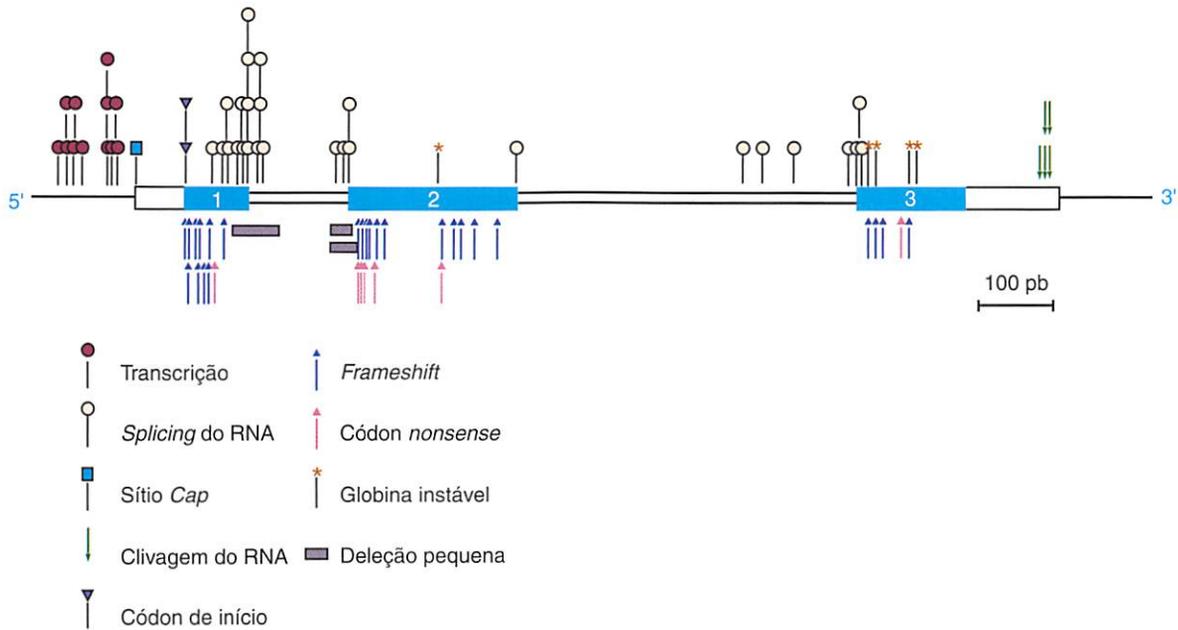
**$\beta$ -Talassemia, Talassemias Complexas e Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal.** Quase todos os tipos de mutação capazes de reduzir a síntese de um RNAm ou de uma proteína têm sido identificados como causa de  $\beta$ -talassemia. A visão geral a seguir desses defeitos genéticos é, portanto, clarificadora sobre os mecanismos mutacionais em geral, descrevendo, em particular, a base molecular de uma das doenças genéticas mais comuns e severas no mundo. As mutações do complexo de genes de  $\beta$ -globina estão separadas em dois grandes grupos, com diferentes fenótipos clínicos. Um grupo de defeitos, que engloba a maioria dos pacientes, compromete apenas a produção de  $\beta$ -globina e causa a  $\beta$ -talassemia simples. O segundo grupo de mutações consiste em grandes deleções que causam as talassemias complexas, nas quais tanto o gene da  $\beta$ -globina como um ou mais dos outros genes — ou a LCR — no *cluster* da  $\beta$ -globina é(são) removido(s). Finalmente, algumas deleções dentro do *cluster* da  $\beta$ -globina não causam talassemia, mas sim um fenótipo benigno chamado de **persistência hereditária da hemoglobina fetal** (i.e., a persistência da expressão do gene da  $\gamma$ -globina durante a vida adulta) que nos informa sobre a regulação da expressão gênica da globina.

**A Base Molecular da  $\beta$ -Talassemia Simples.** A  $\beta$ -talassemia simples resulta de uma marcada diversidade de defeitos

moleculares, predominantemente mutações pontuais no gene da  $\beta$ -globina (Fig. 11-10; Tabela 11-5). A maioria das mutações que causam a  $\beta$ -talassemia simples leva a um decréscimo na abundância do RNAm da  $\beta$ -globina e inclui mutantes na região promotora, mutantes do *splicing* de RNA (os mais comuns), mutantes relativos à adição do *cap* e da cauda poli(A) do RNAm, e mutações de mudança de matriz de leitura (*frameshift*) e sem sentido (*nonsense*) que introduzem códons de término prematuros dentro da região codificante do gene. Algumas poucas variantes estruturais da hemoglobina também comprometem o processamento do RNAm da  $\beta$ -globina, como exemplificado pela Hb E (descrita a seguir).

**Mutações do *Splicing* do RNA.** A maioria dos pacientes com  $\beta$ -talassemia que têm abundância reduzida do RNAm da  $\beta$ -globina apresenta anormalidades no *splicing* do RNA. Mais de duas dezenas de defeitos deste tipo já foram descritos, e sua importância clínica combinada tem grande relevância. Essas mutações também ganharam grande visibilidade devido aos seus efeitos no *splicing* serem frequente e inesperadamente complexos, e a análise dos RNAm mutantes tem contribuído muito para o conhecimento de sequências críticas para o processamento normal do RNA (introduzido no Cap. 3). Os defeitos de *splicing* são separados em três grupos (Fig. 11-11), dependendo da região do RNA não processado na qual a mutação está localizada.

- **Mutações de junção de corte** incluem mutações nas junções de corte do sítio doador 5' ou aceptor 3' dos introns ou nas sequências consenso adjacentes às junções. A natureza crítica do dinucleotídeo GT conservado no



**Figura 11-10** Mutações pontuais e pequenas deleções representativas que causam  $\beta$ -talassemia. Note a distribuição de mutações ao longo do gene e que as mutações afetam praticamente todos os processos necessários para a produção da  $\beta$ -globina normal. Mais de 100 mutações pontuais diferentes na  $\beta$ -globina estão associadas com a  $\beta$ -talassemia simples. *Veja Fontes & Agradecimentos.*

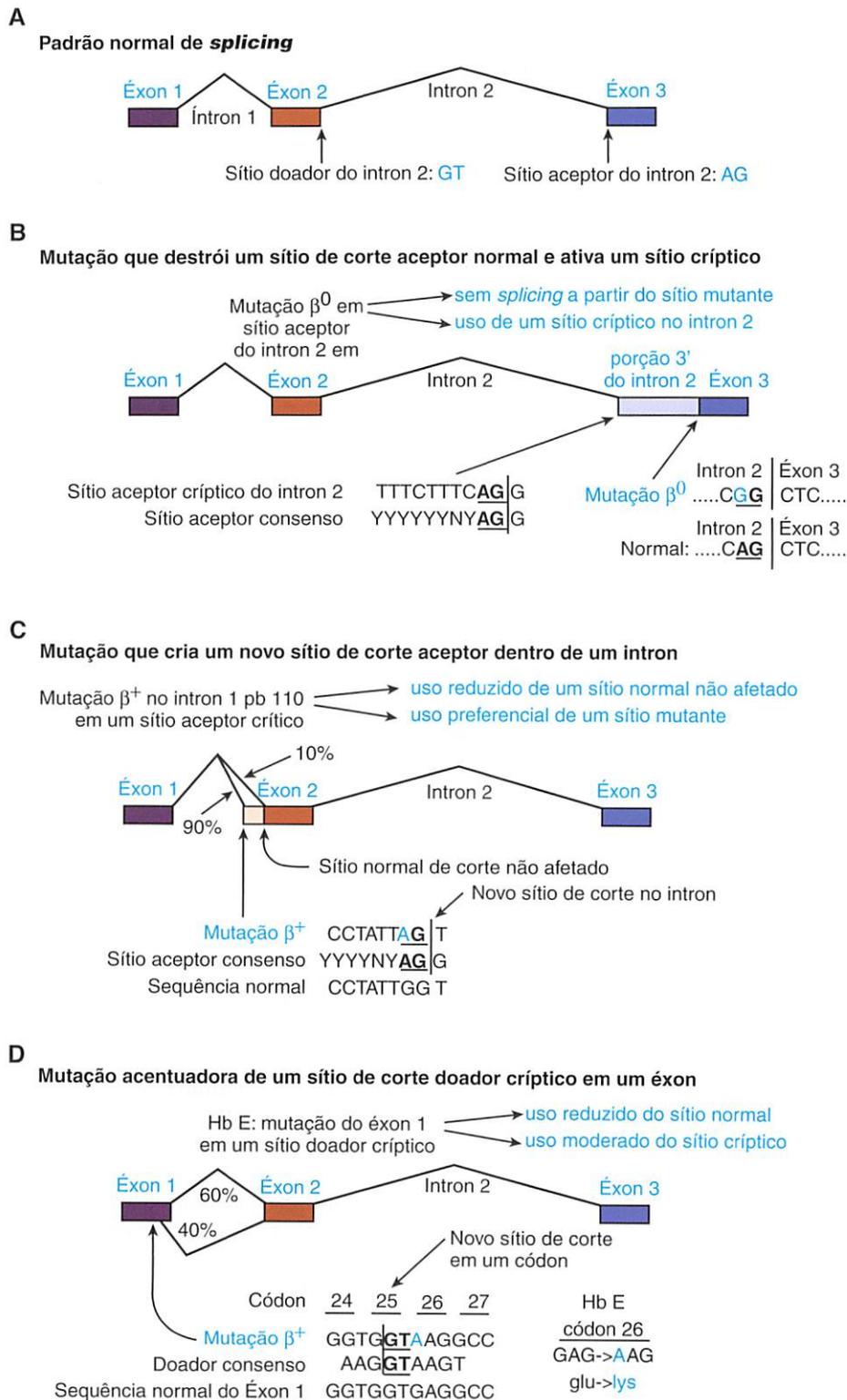
sítio doador 5' do intron e do AG no sítio aceptor 3' (Cap. 3) é demonstrada pela perda completa do *splicing* normal quando ocorrem mutações nesses dinucleotídeos (Fig. 11-11B). A inativação do sítio aceptor normal resulta na utilização de outras sequências semelhantes ao aceptor em alguma outra posição na molécula precursora do RNA. Esses sítios alternativos são chamados de **sítios crípticos de corte** porque eles normalmente não são usados pelo aparato de *splicing* quando o sítio correto está disponível. Os sítios de corte doadores ou aceptores crípticos podem ser encontrados em éxons ou em introns.

- **Mutações intrônicas** resultam de defeitos dentro de um sítio críptico de corte de um intron, que aumentam o uso do sítio críptico, tornando-o mais similar ou idêntico ao sítio normal de corte. O sítio críptico “ativado” compete assim com o sítio normal, com efetividade variável, reduzindo assim a abundância do RNAm normal, devido ao decréscimo do *splicing* no sítio correto, que permanece perfeitamente intacto (Fig. 11-11C). Mutações em sítios de corte crípticos são frequentemente “pouco estringentes”, o que significa que alguma utilização do sítio normal pode ocorrer, produzindo o fenótipo de  $\beta^+$ -talassemia.
- **Mudanças na sequência codificante que também afetam o *splicing*** resultam de mutações na fase de leitura aberta que podem ou não alterar a sequência de aminoácidos, mas que ativam um sítio de corte críptico em um éxon (Fig. 11-11D). Por exemplo, uma forma branda da  $\beta^+$ -talassemia resulta da mutação no códon

24 (Tabela 11-5) que ativa um sítio de corte críptico, mas não altera o aminoácido codificado (ambos, GGT e GGA, codificam glicina [Tabela 3-1]); este é um exemplo de **mutação sinônima** que *não* é neutra em seu efeito.

**RNAs Não Funcionais.** Alguns RNAs não são funcionais e assim não podem dirigir a síntese de um polipeptídeo completo, já que a mutação gera um códon de término prematuro, que termina prematuramente a tradução. Duas mutações da  $\beta$ -talassemia próximas à extremidade aminoterminal exemplificam esse efeito (Tabela 11-5). Em uma (Gln39Término), a falha na tradução se deve a uma única substituição nucleotídica que cria uma **mutação sem sentido** (*nonsense*). Em outra, uma **mutação de matriz de leitura** (frameshift) resulta da deleção de um único par de bases no início da fase de leitura aberta, removendo o primeiro nucleotídeo do códon 16, que normalmente codifica glicina; na fase de leitura aberta mutante, um códon de término prematuro é logo encontrado a jusante, bem antes do sinal de término normal. Já que a  $\beta$ -globina não é produzida a partir desses alelos, ambos os tipos de mutações de RNAm não funcionais causam  $\beta^0$ -talassemia no estado homocigoto. Algumas vezes, mudanças na matriz de leitura próxima à extremidade carboxiterminal da proteína permite que a maior parte do RNAm seja traduzida normalmente, ou que se produza cadeias de globina alongadas que dão origem a uma hemoglobina variante, em vez da  $\beta^0$ -talassemia.

Além de bloquear a produção do polipeptídeo de  $\beta$ -globina, os códon *nonsense*, incluindo os dois descritos anteriormente, com frequência resultam em uma redução na



**Figura 11-11** Exemplos de muta es que afetam o *splicing* normal do gene da  $\beta$ -globina causando a  $\beta$ -talassemia. A, Padrão normal de *splicing*. B, Uma muta o no intron 2 (IVS2-2A>G) no sítio de corte aceitador normal abole o *splicing* normal. Essa muta o resulta no uso de um sítio aceitador críptico no intron 2. O sítio críptico se acomoda perfeitamente   sequência de corte aceitadora consensual (onde Y é uma pirimidina, T ou C). Como o éxon 3 foi aumentado na sua extremidade 5' pela inclusão de sequências do intron 2, o RNA mensageiro (RNAm) anormal, produzido pelo gene mutante, perde a fase de leitura aberta correta e não pode codificar a  $\beta$ -globina. C, Uma muta o no intron 1 (G > A no par de bases 110 do intron 1) ativa um sítio aceitador críptico, criando um dinucleotídeo AG, e aumenta sua semelhança com a sequência consenso do sítio aceitador. Então o RNAm de globina formado   alongado (19 nucleotídeos extras) no lado 5' do éxon 2; um códon de término prematuro é introduzido no transcrito. O fenótipo da  $\beta^+$ -talassemia ocorre porque o sítio aceitador correto ainda é usado, embora o nível do tipo selvagem seja de apenas 10%. D, No defeito Hb E, uma muta o *missense* (Glu26Lys) no códon 26 do éxon 1 ativa um sítio de corte doador críptico no códon 25, que compete efetivamente com o sítio doador normal. Essa via alternativa de *splicing* tem uso moderado, mas a maior parte do RNA ainda é processada a partir do sítio correto, resultando em  $\beta^+$ -talassemia branda.

abundância do RNAm mutante e, de fato, os RNAs podem não ser detectados. Os mecanismos que são a base desse fenômeno, chamado de **decaimento de RNAm mediado por mutações nonsense**, parecem estar restritos a códon nonsense localizados a mais de 50 pb a montante da junção éxon-éxon final.

**Defeitos na Adição do Cap e da Cauda Poli(A) do RNAm da  $\beta$ -Globina.** Várias mutações de  $\beta^+$ -talassemia demonstram a natureza crítica das modificações pós-transcricionais dos RNAs. Por exemplo, a 3'-UTR de quase todos os RNAs terminam com uma sequência poli(A), e se esta sequência não for adicionada, o RNAm fica instável. Como introduzido no Capítulo 3, a poliadenilação do RNAm precisa primeiro da clivagem enzimática do RNAm, que ocorre em resposta a um sinal de clivagem, AAUAAA, encontrado próximo à extremidade 3' da maioria dos RNAs eucarióticos. Pacientes que possuem uma substituição que altera a sequência sinal para AACAAA produzem apenas uma pequena fração de RNAm de  $\beta$ -globina poliadenilada da maneira correta.

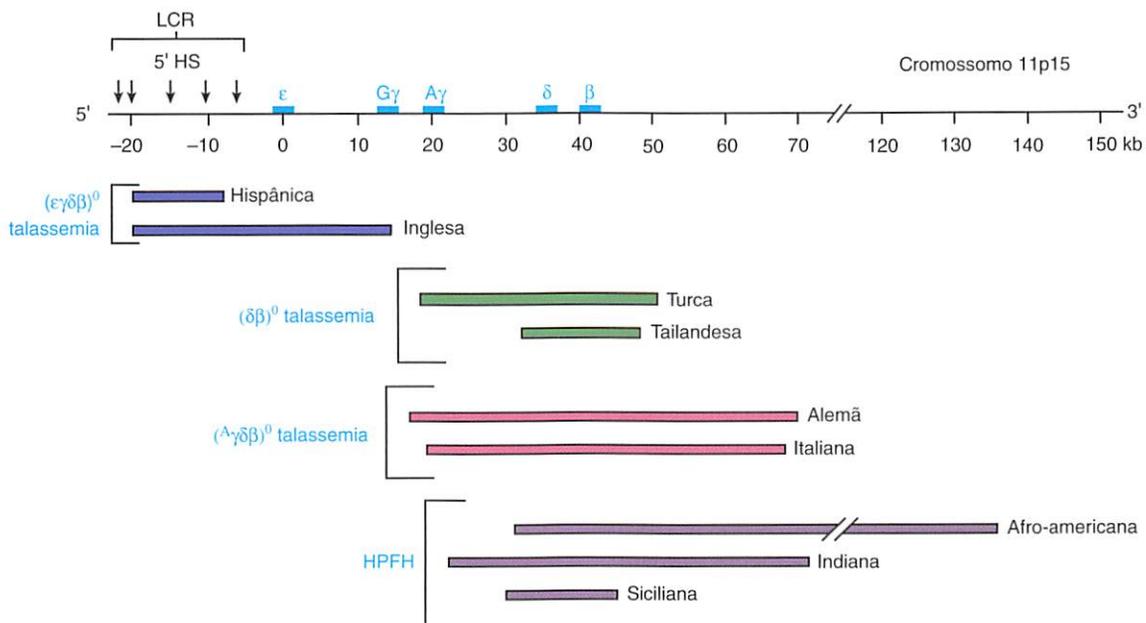
### Hemoglobina E: Uma Hemoglobina Variante que Resulta em Fenótipos de Talassemia

A Hb E é provavelmente a hemoglobina estruturalmente anormal mais comum no mundo, ocorrendo com alta frequência no sudeste asiático, onde existem pelo menos um milhão de homocigotos e 30 milhões de heterocigotos. A Hb E é uma variante da  $\beta$ -globina (Glu26Lys) que reduz a taxa de síntese da cadeia  $\beta$ -mutante, e é outro exemplo

de uma mutação na sequência codificante que também prejudica o *splicing* normal pela ativação de sítios de corte crípticos (Fig 11-10D). Apesar de os homocigotos para a Hb E serem assintomáticos, e apenas brandamente anêmicos, indivíduos que são composto genéticos de Hb E e outro alelo ligado à  $\beta$ -talassemia têm fenótipos anormais que são amplamente determinados pela severidade do outro alelo.

### Talasseмии Complexas e a Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal

Como mencionado anteriormente, grandes deleções que causam **talassemias complexas** removem o gene na  $\beta$ -globina e mais um ou mais dos outros genes — ou a LCR — do *cluster* de  $\beta$ -globina. Assim, indivíduos afetados possuem expressão reduzida de  $\beta$ -globina e de uma ou mais cadeias do tipo  $\beta$ . Esses distúrbios são nomeados de acordo com os genes deletados, por exemplo, a  $(\delta\beta)^0$ -talassemia ou a  $(\gamma\delta\beta)^0$ -talassemia, e assim por diante (Fig. 11-12). As deleções que removem a LCR da  $\beta$ -globina começam cerca de 50 a 100 kb a montante do *cluster* de genes da  $\beta$ -globina e se estendem até 3', em graus variados. Apesar de algumas dessas deleções (como a deleção Hispânica mostrada na Fig. 11-12) deixarem todos ou alguns dos genes do *locus* da  $\beta$ -globina completamente intactos, elas bloqueiam a expressão do *cluster* inteiro, causando a  $(\epsilon\gamma\delta\beta)^0$ -talassemia. Essas mutações demonstram a total dependência entre a expressão do *cluster* de genes da  $\beta$ -globina e a integridade da LCR (Fig. 11-4).



**Figura 11-12** Localização e tamanho das deleções de vários mutantes de  $(\epsilon\gamma\delta\beta)^0$ -talassemia,  $(\delta\beta)^0$ -talassemia,  $(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ -talassemia e HPFH. Note que as deleções na região controladora de *locus* (LCR) impedem a expressão de todos os genes do *cluster* de  $\beta$ -globina. As deleções responsáveis pela  $\delta\beta$ -talassemia,  $\Delta\gamma\delta\beta$ -talassemia e HPFH se sobrepõem (veja o texto). HPFH, persistência hereditária da hemoglobina fetal; HS, sítios hipersensíveis. *Veja Fontes & Agradecimentos.*

Um segundo grupo de grandes deleções do *cluster* de genes da  $\beta$ -globina de significância médica é aquele que deixa pelo menos um dos genes  $\gamma$  intactos (como a deleção Inglesa na Fig. 11-12). Pacientes portadores dessas mutações apresentam uma de duas manifestações clínicas, dependendo da deleção:  $\delta\beta^0$ -talassemia ou uma condição benigna chamada de persistência hereditária da hemoglobina fetal (HPFH) que se deve ao bloqueio da troca perinatal da síntese de  $\gamma$ -globina pela de  $\beta$ -globina. Os homocigotos com uma dessas condições são viáveis porque o gene  $\gamma$  ou genes remanescentes ainda estão ativos após o nascimento, em vez de serem desligados como ocorreria normalmente. Como resultado, a síntese de Hb F ( $\alpha^2\beta^2$ ) continua em altos níveis no período pós-natal e compensa a ausência de Hb A.

A natureza clinicamente inócua da HPFH, que resulta da produção substancial de cadeias  $\gamma$ , se deve ao alto nível de Hb F nos heterocigotos (17% a 35% de Hb F) comparado àquele geralmente observado nos heterocigotos de  $\delta\beta^0$ -talassemia (5%-18% de Hb F). Já que as mutações que causam  $\delta\beta^0$ -talassemia se sobrepõem àquelas que causam HPFH (Fig. 11-12), não está claro porque pacientes com HPFH apresentam níveis mais altos de expressão do gene  $\gamma$ . Uma possibilidade é que algumas deleções da HPFH trazem os acentuadores mais para perto de genes de  $\gamma$ -globina. Indícios do papel de reguladores da expressão de Hb F, como o BCL11A e o MYB (veja a discussão anterior), derivam em parte de estudo de pacientes com deleções complexas no *cluster* de genes de  $\beta$ -globina. Por exemplo, o estudo de vários indivíduos com HPFH resultante de deleções raras no *cluster* de genes da  $\beta$ -globina identificou uma região de 3,5 kb, próxima à extremidade 5' do gene da  $\delta$ -globina, que contém sítios de ligação para BCL11A, um silenciador crítico da expressão de Hb F no adulto.

## Estratégias de Saúde Pública para Prevenir as Talassemias

**Triagem Populacional em Grande Escala.** A severidade clínica de muitas formas de talassemia, combinada com a sua alta frequência, impõe uma tremenda carga à saúde pública em muitas sociedades. Somente na Tailândia, por exemplo, a Organização Mundial da Saúde determinou que em um milhão de crianças pelo menos um quarto ou metade delas tem formas graves de talassemia. Para reduzir a alta incidência da doença em algumas partes do mundo, os governos têm introduzido com sucesso os programas de controle de talassemia com base na oferta e exigência de triagem de indivíduos portadores na população infantil (Quadro). Como resultado desses programas, em muitas partes do Mediterrâneo a taxa de nascimentos de crianças afetadas tem sido reduzida em quase 90%, por meio de programas educacionais dirigidos à população em geral e aos prestadores de serviços de saúde. Na Sardenha, foi iniciado em 1975 um programa de rastreamento voluntário seguido por testes extensivos às famílias, uma vez que o portador seja identificado.

## ASPECTOS ÉTICOS E SOCIAIS RELACIONADOS À TRIAGEM POPULACIONAL PARA $\beta$ -TALASSEMIA\*

*Aproximadamente 70.000 crianças nascem no mundo a cada ano com  $\beta$ -talassemia, com alto custo econômico para os sistemas de saúde e grande custo emocional para as famílias afetadas.*

A triagem é realizada em muitos países para identificar os indivíduos e famílias sob risco aumentado para a doença. Diretrizes nacionais e internacionais recomendam que a triagem não seja compulsória e que a educação e o aconselhamento genético devam informar a tomada de decisão. *Fatores culturais, religiosos, econômicos e sociais amplamente diferentes influenciam a adesão às diretrizes. Por exemplo:*

Na Grécia, a triagem é voluntária, disponível em caráter pré-nupcial e pré-natal, exige o termo de consentimento, é amplamente divulgada pelas mídias de massa e em programas militares e escolares, e também é acompanhada por aconselhamento genético para casais portadores.

No Irã e na Turquia, essas práticas diferem apenas pelo fato de que a triagem é obrigatória antes do casamento (mas em todos os países onde a triagem é obrigatória, os casais de portadores têm o direito de se casar caso desejem).

Em Taiwan, a triagem pré-natal está disponível e é voluntária, mas o termo de consentimento não é necessário e a triagem não é atualmente acompanhada de programas educacionais ou de aconselhamento genético.

No Reino Unido, a triagem é oferecida a todas as gestantes, mas a conscientização pública é baixa, e a triagem voluntária é questionável porque várias, se não a maioria, das mulheres testadas não são avisadas que foram testadas a não ser que se descubra que são portadoras. Em alguns programas do Reino Unido, as mulheres não recebem os resultados do teste.

*Principais obstáculos para uma triagem populacional mais eficaz para a  $\beta$ -talassemia*

Os principais obstáculos incluem os fatos de que mulheres grávidas sentem-se sobrecarregadas pela variedade de testes a elas oferecidos, os profissionais não têm conhecimento suficiente sobre os distúrbios genéticos, a educação e aconselhamento apropriados são dispendiosos, comumente informando incorretamente às mulheres sobre um teste como sendo equivalente ao consentimento, e a efetividade da educação em massa varia grandemente, dependendo da comunidade ou país.

*A eficácia dos programas bem executados de triagem de  $\beta$ -talassemia*

Em populações nas quais a triagem de  $\beta$ -talassemia foi efetivamente implementada, a redução na incidência da doença tem sido impressionante. Por exemplo, na Sardenha, a triagem entre 1975 e 1995 reduziu a incidência de um caso em 250 indivíduos para um em 4.000. De maneira similar, em Ciprus, a incidência de nascidos afetados caiu de 51, em 1974, para nenhum, em 2007.

\*Baseado em Cousens NE, Gaff CL, Metcalfe SA, et al: Carrier screening for  $\beta$ -thalassaemia: a review of international practice, *Eur J Hum Genet* 18:1077-1083, 2010.

**Triagem Restrita a Famílias Grandes.** Nos países em desenvolvimento, o início de programas de triagem para a talassemia é um grande desafio econômico e logístico. Trabalhos recentes no Paquistão e Arábia Saudita, entre-

tanto, demonstraram a efetividade de uma estratégia de triagem que pode ser amplamente aplicada em países onde os casamentos consanguíneos são comuns. Na região de Rawalpindi, no Paquistão, a  $\beta$ -talassemia está bastante restrita a um grupo específico de famílias que chamou atenção porque apresentava um probando identificável (Cap. 7). Em 10 grandes famílias com esse tipo de caso indexado, o teste de cerca de 600 pessoas estabeleceu que aproximadamente 8% dos casais examinados consistiam em um par de portadores, enquanto não foram identificados casais sob risco em 350 mulheres grávidas e seus parceiros, sendo estes selecionados aleatoriamente entre pessoas que não pertenciam a essas 10 famílias. Todos os portadores relataram que a informação fornecida foi usada para evitar gestações posteriores, caso eles já tivessem dois ou mais filhos saudáveis ou, no caso de um ou nenhum filho saudável, o resultado fosse usado para a realização de diagnóstico pré-natal. Apesar de o grande impacto desse programa ser estabelecido em longo prazo, os testes de triagem desse tipo, envolvendo famílias numerosas, deve contribuir de forma relevante no controle de doenças recessivas em diferentes partes do mundo, onde a preferência cultural pelo casamento consanguíneo está presente. Em outras palavras, devido à consanguinidade, variantes gênicas de doenças ficam “restritas” dentro da mesma família, e assim uma criança afetada torna-se um indicador nessa extensa família sob alto risco para a doença.

O início de programas de testes para detecção de portadores e de diagnóstico pré-natal para a talassemia exige, além da educação da população e dos médicos, o estabelecimento de laboratórios centrais preparados e o consenso da população a ser triada (Quadro). Apesar de os amplos programas populacionais de controle da talassemia serem indiscutivelmente mais baratos que o custo do tratamento de uma grande população de indivíduos afetados durante toda

sua vida, a tentativa dos governos e médicos em pressionar os indivíduos a aceitar esses programas deve ser evitada. A autonomia dos indivíduos na sua escolha reprodutiva, pedra fundamental da bioética moderna, e as visões culturais e religiosas de suas comunidades devem ser respeitadas.

## REFERÊNCIAS GERAIS

- Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G: Thalassemia, *Lancet* 379:373-383, 2012.
- Higgs DR, Gibbons RJ: The molecular basis of  $\alpha$ -thalassemia: a model for understanding human molecular genetics, *Hematol Oncol Clin North Am* 24:1033-1054, 2010.
- McCavit TL: Sickle cell disease, *Pediatr Rev* 33:195-204, 2012.
- Roseff SD: Sickle cell disease: a review, *Immunohematology* 25:67-74, 2009.
- Weatherall DJ: The role of the inherited disorders of hemoglobin, the first “lecular diseases,” in the future of human genetics, *Annu Rev Genomics Hum Genet* 14:1-24, 2013.

## REFERÊNCIAS PARA TÓPICOS ESPECÍFICOS

- Bauer DE, Orkin SH: Update on fetal hemoglobin gene regulation in hemoglobinopathies, *Curr Opin Pediatr* 23:1-8, 2011.
- Ingram VM: Specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin, *Nature* 178:792-794, 1956.
- Ingram VM: Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin, *Nature* 180:326-328, 1957.
- Kervestin S, Jacobson A: NMD, a multifaceted response to premature translational termination, *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:700-712, 2012.
- Pauling L, Itano HA, Singer SJ, et al: Sickle cell anemia, a molecular disease, *Science* 110:543-548, 1949.
- Sankaran VG, Lettre G, Orkin SH, et al: Modifier genes in Mendelian disorders: the example of hemoglobin disorders, *Ann N Y Acad Sci* 1214:47-56, 2010.
- Steinberg MH, Sebastiani P: Genetic modifiers of sickle cell disease, *Am J Hematol* 87:795-803, 2012.
- Weatherall DJ: The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden, *Blood* 115:4331-4336, 2010.

## PROBLEMAS

1. Uma criança morreu de hidropsia fetal. Desenhe o herodograma com genótipos que ilustram aos pais portadores a base genética da talassemia da criança. Explique porque um casal, que eles conheceram na clínica de hematologia, e em que ambos possuem o traço de  $\alpha$ -talassemia, provavelmente não terá filhos afetados de forma similar.
  2. Por que a maioria dos pacientes com  $\beta$ -talassemia provavelmente compreende compostos genéticos? Em quais situações você poderia prever que um paciente com  $\beta$ -talassemia provavelmente teria dois alelos de  $\beta$ -globina idênticos?
  3. Tony, um jovem italiano, tem  $\beta$ -talassemia moderada, com uma concentração de hemoglobina de 7 g/dL (concentrações normais são de 10 a 13 g/dL). Quando você realiza um *Northern blot* do RNA de seus reticulócitos, inesperadamente encontra três bandas de RNAm da  $\beta$ -globina, uma de tamanho normal, uma maior que o normal, e uma menor que o normal.
- Quais mecanismos mutacionais poderiam ser responsáveis pela presença das três bandas conforme observado neste paciente com  $\beta$ -talassemia? Neste paciente, o fato de a anemia ser branda sugere que uma fração significativa do RNAm da  $\beta$ -globina normal está sendo produzida. Que tipos de mutação poderiam permitir isto?
4. Um homem é heterozigoto para a Hb M Saskatoon, uma hemoglobinopatia na qual um aminoácido normal His é substituído por Tyr na posição 63 da cadeia  $\beta$ . Sua parceira é heterozigota para a Hb M Boston, na qual a His é substituída por Tyr na posição 58 da cadeia  $\alpha$ . A heterozigose para qualquer um desses alelos mutantes produz meta-hemoglobina. Descreva os possíveis genótipos e fenótipos de sua prole.
  5. Uma criança tem um tio paterno e uma tia materna com anemia falciforme; mas nenhum de seus pais tem a doença. Qual a probabilidade de que esta criança tenha anemia falciforme?

6. Uma mulher tem o traço falciforme, e seu parceiro é heterozigoto para a Hb C. Qual a probabilidade de seus filhos não possuírem hemoglobina anormal?

7. Correlacione as duas colunas:

_____ β-talassemia complexa	1. Hb A detectável
_____ β <sup>+</sup> -talassemia	2. três
_____ número de genes de α-globina ausentes na doença da Hb H	3. β-talassemia
_____ dois alelos mutantes diferentes em um <i>locus</i>	4. α-talassemia
_____ síndrome ATR-X	5. alto nível de expressão de cadeias β
_____ cadeias-β insolúveis	6. traço de α-talassemia
_____ número de genes de α-globina ausentes na hidropsia fetal com Hb de Bart	7. heterozigoto composto
_____ região controladora de <i>locus</i>	8. deleção de genes δ β
_____ genótipo α - /α -	9. quatro
_____ Hb A2 aumentada	10. deficiência intelectual

8. Mutações nas sequências não codificantes podem alterar o número de moléculas proteicas produzidas, mas cada molécula proteica sintetizada geralmente terá uma sequência normal de aminoácidos. Dê exemplos de algumas exceções a esta regra, e descreva como alterações na sequência de aminoácidos são geradas.

9. Quais são as possíveis explicações para o fato de que os programas de controle de talassemia, como aquele bem-sucedido da Sardenha, não reduziram a zero a taxa de nascimento de bebês com talassemia severa? Por exemplo, na Sardenha, de 1999 a 2002, nasceram aproximadamente de duas a cinco crianças deste tipo a cada ano.