

Talassemias: Etiologia, Fisiopatologia, Diagnóstico e Abordagens Terapêuticas

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



## Talassemias

# Etiologia, Fisiopatologia, Diagnóstico e Abordagens terapêuticas

**Sara Santana Martinho e Gomes Polainas**

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**2016 – 2017**

Talassemias: Etiologia, Fisiopatologia, Diagnóstico e Abordagens Terapêuticas

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



## Talassemias

# Etiologia, Fisiopatologia, Diagnóstico e Abordagens terapêuticas

**Sara Santana Martinho e Gomes Polainas**

Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentada  
à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia

Orientador: Professora Doutora Isabel Bettencourt Moreira da Silva

**2016 – 2017**

## Resumo

As talassemias são um grupo de anomalias hereditárias em que se verifica uma deficiência a nível da hemoglobina (Hb) devido a uma síntese reduzida ou ausente das cadeias de globina, a qual é causada por mutações nos genes que codificam para as mesmas ou nas suas regiões regulatórias. As talassemias são as doenças monogénicas hereditárias mais comuns do mundo. A alfa ( $\alpha$ ) talassemia resulta da diminuição ( $\alpha^+$ ) ou ausência ( $\alpha^0$ ) da síntese da cadeia de  $\alpha$  globina, sendo que esta é codificada por quatro genes distintos ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ), dois genes (*HBA1* e *HBA2*) em cada cópia do cromossoma 16 homólogo. A beta ( $\beta$ ) talassemia resulta da diminuição ( $\beta^+$ ) ou ausência ( $\beta^0$ ) da síntese da cadeia de  $\beta$  globina, sendo que esta é codificada por dois genes distintos ( $\beta/\beta$ ), um gene *HBB* em cada cópia do cromossoma 11 homólogo. A talassemia é caracterizada por uma anemia microcítica e hipocrômica, sendo que a severidade da anemia varia com o número de genes não funcionais. Na  $\alpha$  talassemia, a Hb A<sub>2</sub> encontra-se normal ou diminuída e o esfregaço de sangue pode apresentar Hb H e/ou Hb de Bart. A  $\beta$  talassemia é caracterizada por um aumento de Hb A<sub>2</sub> e Hb F e uma diminuição da Hb A. O diagnóstico das talassemias inclui a avaliação dos índices hematológicos e a quantificação da Hb A<sub>2</sub> e da Hb F, juntamente com a deteção de Hb variantes, através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), eletroforese capilar (EC) ou focagem isoeletrica (FIE). A confirmação definitiva do diagnóstico é obtida pela análise do DNA. Os doentes com talassemia apresentam hepatoesplenomegalia, absorção aumentada de ferro, atrasos de crescimento e anemia crónica, causados pela hemólise e pela eritropoiese ineficaz. A única cura definitiva para a talassemia é o transplante de medula óssea (TMO) e a terapia da doença baseia-se nas transfusões de sangue (TS) e na quelação de sangue, de forma a manter níveis de Hb pré-transfusão de 9-10,5 g/dL.

Palavras-chave:  $\alpha/\beta$  talassemia; hemoglobinopatias; hemoglobina; talassemia etiologia/diagnostico/terapia/epidemiologia/quelação de ferro.

## Abstract

Thalasseмии are a group of haemoglobin disorders due to a reduced or absent synthesis of globin chains, caused by mutations in the globin genes or in their regulatory regions. Thalasseмии are the most common monogenic inherited disorders worldwide. Alpha ( $\alpha$ ) thalasseмии results from the decrease ( $\alpha^+$ ) or absence ( $\alpha^0$ ) of the  $\alpha$  globin chain synthesis, which is encoded by four distinct genes ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ), two genes (*HBA1* and *HBA2*) in each copy of homologous chromosome 16. Beta ( $\beta$ ) thalasseмии results from the decrease ( $\beta^+$ ) or absence ( $\beta^0$ ) of  $\beta$  globin synthesis, which is encoded by two distinct genes ( $\beta/\beta$ ), one *HBB* gene in each copy of homologous chromosome 11. Thalasseмии is characterized by microcytic and hypochromic anaemia, and the severity of the anaemia varies with the number of non-functional genes. In  $\alpha$  thalasseмии Hb A<sub>2</sub> is normal or slightly decreased and the blood smear may present Hb H and/or Hb Bart. The  $\beta$  thalasseмии is characterized by an increase in Hb A<sub>2</sub> and Hb F and a decrease in Hb A. The diagnosis of thalasseмии includes the assessment of haematological indices and quantification of Hb A<sub>2</sub> and Hb F together with the detection of variant Hb, through high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis or isoelectric focusing. Definitive confirmation of the diagnosis is obtained by DNA analysis. Patients with thalasseмии exhibit hepatosplenomegaly, increased iron absorption, growth retardation and chronic anaemia due to haemolysis and ineffective erythropoiesis. The only definitive cure for thalasseмии is bone marrow transplantation and the management of the disease includes blood transfusions and iron chelation, to maintain pre-transfusion haemoglobin levels of 9-10.5 g / dL.

Keywords:  $\alpha/\beta$  thalasseмии; hemoglobinopathies; haemoglobin; thalasseмии etiology/diagnosis/therapy/epidemiology/iron chelation.

## **Agradecimentos**

À Professora Doutor Isabel Moreira da Silva, a quem eu estou eternamente grata, por todo o seu apoio, incentivo, conhecimentos, e sobretudo, por me ter inspirado. A sua inspiração deu um novo rumo à minha vida.

Ao meu avô, que continua a impressionar-me todos os dias com a sua força de vontade.

Aos meus pais, por me mostrarem o verdadeiro significado de nunca desistir. Sem o vosso apoio e a vossa paciência eu nunca teria chegado aqui.

Ao Tomás Polainas, que eu um dia me torne a pessoa extraordinária que tu acreditas que eu sou. Por ti, tudo.

## Abreviaturas, Símbolos e Acrônimos

ADF – anemia por deficiência em ferro

CFF – concentração de ferro no fígado

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

CS – Constant Spring

DEVH – doença do enxerto versus o hospedeiro

DFO - desferroxamina

DFP – deferiprona

DFX – desferasirox

DGPI – diagnóstico genético pré-implantação

DGS – Direção Geral de Saúde

DNA – ácido desoxirribonucleico

EC – eletroforese capilar

FIE – focagem isoelétrica

Gene *HBA* – gene que codifica a síntese da hemoglobina alfa

Gene *HBA1* – gene que codifica a síntese da hemoglobina alfa 1

Gene *HBA2* – gene que codifica a síntese da hemoglobina alfa 2

Gene *HBB* – gene que codifica a síntese da hemoglobina beta

Gene *HBD* – gene que codifica a síntese da hemoglobina delta

Gene *HBG* – gene que codifica a síntese da hemoglobina gama

GV – glóbulos vermelhos

Hb – hemoglobina

Hb A – hemoglobina do adulto

Hb A<sub>2</sub> – hemoglobina do adulto tipo 2

## Talassemias: Etiologia, Fisiopatologia, Diagnóstico e Abordagens Terapêuticas

Hb C – hemoglobina C

Hb de Bart – hemoglobina de Bart

Hb E – hemoglobina E

Hb F – hemoglobina F

Hb H – hemoglobina H

Hb H CS – hemoglobina H de Constante Spring

Hb S – hemoglobina S

HGM – hemoglobina globular média

HLA – antígenos leucocitários humanos

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

LCR – *Locus Control Region*,

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

O<sub>2</sub> - oxigênio

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – reação em cadeia da polimerase

PHHF – Persistência Hereditária da Hemoglobina F

PNCH – Programa Nacional de Controlo das Hemoglobinopatias

QS – Quong Sze

RDW – *Red Cell Distribution Width*

RICD – ruturas induzidas de cadeia dupla

RM – ressonância magnética

SPG – sequenciação da próxima geração

TMO – transplante de medula óssea

## Talassemias: Etiologia, Fisiopatologia, Diagnóstico e Abordagens Terapêuticas

TS – transfusões de sangue

UC – unidade curricular

VGM – volume globular média

$\alpha$  - alfa

$\beta$  - beta

$\delta$  - delta

$\varepsilon$  – épsilon

$\gamma$  - gama

$\zeta$  - zeta



# 1. Índice

<b>Resumo</b> .....	<b>- 2 -</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>- 3 -</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>- 4 -</b>
<b>Abreviaturas e Símbolos</b> .....	<b>- 5 -</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>- 11 -</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>- 12 -</b>
<b>2. Introdução</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>- 3 -</b>
<b>4. Materiais e métodos</b> .....	<b>- 4 -</b>
<b>5. Hemoglobina</b> .....	<b>- 5 -</b>
<b>5.1. Estrutura e Função</b> .....	<b>- 5 -</b>
<b>5.2. Síntese da Hb e genes globínicos</b> .....	<b>- 7 -</b>
5.3. Agrupamento génico da alfa globina .....	- 8 -
5.4. Agrupamento génico da beta globina .....	- 9 -
<b>6. Hemoglobinopatias</b> .....	<b>- 10 -</b>
<b>7. Talassemias</b> .....	<b>- 11 -</b>
7.1. Classificação .....	- 11 -
7.2. Epidemiologia.....	- 12 -
	- 8 -

<b>8. Alfa Talassemia .....</b>	<b>- 15 -</b>
8.1. Portador Silencioso de Alfa Talassemia .....	- 17 -
8.2. Alfa talassemia minor .....	- 17 -
8.3. Doença da Hb H.....	- 17 -
8.4. Hidropisia fetal de Bart.....	- 18 -
<b>9. Beta Talassemia.....</b>	<b>- 20 -</b>
9.1. Beta Talassemia Minor .....	- 21 -
9.2. Beta Talassemia Intermédia.....	- 22 -
9.3. Beta Talassemia Major .....	- 23 -
<b>10. Variantes de Hb e outras Talassemias .....</b>	<b>- 25 -</b>
<b>11. Diagnóstico.....</b>	<b>- 27 -</b>
11.1. Métodos Bioquímicos .....	- 27 -
11.1.1. HPLC .....	- 32 -
11.1.2. Eletroforese Capilar .....	- 32 -
11.1.3. Focagem Isoelétrica .....	- 33 -
11.2. Métodos Moleculares.....	- 33 -
11.3. Doseamento da Hb F .....	- 34 -
11.4. Dificuldades no diagnóstico .....	- 35 -
<b>12. Abordagens Terapêuticas .....</b>	<b>- 36 -</b>
12.1. Transplante de Medula Óssea.....	- 37 -
12.2. Transfusões de sangue .....	- 39 -

## Talassemias: Etiologia, Fisiopatologia, Diagnóstico e Abordagens Terapêuticas

12.3.	Quelação de ferro.....	- 40 -
12.3.1.	Complicações.....	- 41 -
12.3.2.	Agentes Quelantes .....	- 42 -
12.4.	Prevenção e Rastreio.....	- 43 -
12.4.1.	Rastreio Pré-matrimonial.....	- 43 -
12.4.2.	Rastreio Pré-natal.....	- 44 -
12.4.3.	Diagnóstico Genético Pré-implantação .....	- 44 -
12.5.	Novas Abordagens.....	- 44 -
12.5.1.	Modulação da Expressão da síntese de Hb F.....	- 44 -
12.5.2.	Terapia Genética.....	- 45 -
12.6.	Aconselhamento genético e Cuidados .....	- 45 -
<b>13.</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>- 47 -</b>
<b>14.</b>	<b>Perspetivas Futuras.....</b>	<b>- 49 -</b>
<b>15.</b>	<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>- 51 -</b>

## Índice de Figuras

Figura 1- Curva de dissociação do oxigênio, indicando os efeitos do pH e a temperatura corporal. Adaptado de (1).....	- 6 -
Figura 2- Representação esquemática dos locais e proporção de síntese das diferentes cadeias de globina no período embrionário, fetal e adulto. Adaptado de (1).....	- 8 -
Figura 3- Representação do agrupamento gênico da alfa globina ( $\alpha$ ) e da beta globina ( $\beta$ ). Adaptado de (17,18) .....	- 9 -
Figura 4- Fisiopatologia das talassemias. Adaptado de (2).....	- 12 -
Figura 5- Distribuição global das mutações de alfa talassemia. Adaptado de (15)....	- 13 -
Figura 6- Distribuição global das mutações de beta talassemia. Adaptado de (15) ...	- 14 -
Figura 7- Classificação clínica e correlação genótipo-fenótipo da alfa (direita) e beta (esquerda) talassemia. Adaptado de (2).....	- 16 -
Figura 8- Fluxograma com o procedimento para diagnosticar talassemias. Adaptado de (4) .....	- 29 -
Figura 9- Severidade clínica potencial de hemoglobinopatias em crianças cujos pais têm as doenças indicadas. Adaptado de (5).....	- 36 -

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1- Diagnóstico diferencial de ADF e talassemias, baseado no VGM, na ferritina e na análise de Hb. Adaptado de (5).....	- 30 -
Tabela 2- Principais diferenças entre o HPLC e a EC no diagnóstico de hemoglobinopatias. Adaptado de (9).....	- 31 -

## 2. Introdução

As hemoglobinopatias são doenças hereditárias, de transmissão autossômica recessiva que envolvem alterações na Hb, causadas por mutações nos genes responsáveis pela síntese das cadeias de globina ou nas suas regiões regulatórias (1,2). As hemoglobinopatias são classificadas em duas categorias: qualitativas (Hb variantes), quando há a síntese de uma globina estruturalmente anormal ou quantitativas, quando ocorre uma alteração na síntese das cadeias de globina normais (2,3). As talassemias são caracterizadas por uma diminuição ou ausência de síntese de uma das cadeias de globina e são classificadas de acordo com a cadeia de globina afetada; as formas mais comuns são a  $\alpha$  talassemia e  $\beta$  talassemia (2).

As talassemias são as doenças monogénicas hereditárias mais comuns a nível mundial e estima-se que 1-5% da população mundial seja portadora de uma mutação talassémica (4,5). As talassemias são endémicas de áreas tropicais e subtropicais, com elevada incidência de malária, devido à proteção que os portadores de talassemias apresentam relativamente a esta doença(2). As talassemias têm uma elevada frequência nos países em desenvolvimento, nomeadamente, no Sul e Sudeste Asiático, no Médio Oriente, no Mediterrâneo e no Norte e centro de África. Porém, devido a fenómenos de migração, a sua frequência está a aumentar em outras regiões, como no Norte da Europa, no Norte da América e na Austrália (2,4,6). Em Portugal, as hemoglobinopatias mais comuns são a drepanocitose e a  $\beta$  talassemia, com uma distribuição heterogénea e maior incidência no centro e no Sul do país (7,8).

A sua transmissão hereditária, autossômica e recessiva permite que os portadores de talassemia sejam clinicamente normais. No entanto, quando ambos os pais são portadores, existe, em cada gravidez, 25% de probabilidade que a criança tenha talassemia, 50% de probabilidade que seja portadora de uma mutação talassémica e 25% de probabilidade que venha a ser normal (2). Sendo uma doença hereditária recessiva, os fenótipos com relevância clínica são homocigotos ou apresentam dupla heterocigotia para diferentes mutações nos genes globínicos, ou nas suas regiões regulatórias (4). Sem tratamento, o desequilíbrio da síntese de cadeias de globina dá origem a uma eritropoiese ineficaz, devido à precipitação das cadeias de globina livres em excesso nos glóbulos vermelhos (GV), levando à sua destruição prematura (hemólise) na medula óssea e na corrente sanguínea (4). A severidade do quadro clínico do doente é proporcional ao desequilíbrio

da síntese das cadeias de globina (2). A eritropoiese ineficaz e a consequente hemólise são responsáveis pelas manifestações clínicas das talassemias, que incluem a expansão da medula óssea, a hepatoesplenomegalia e a anemia crônica (4). A apresentação clínica dos portadores varia entre um quadro clínico assintomático e uma anemia severa que requer TS para o resto da vida (5).

O diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias inclui um hemograma completo com a respectiva avaliação dos índices hematológicos, e a quantificação da Hb A<sub>2</sub> e da Hb F, juntamente com a detecção de Hb variantes, através de HPLC, EC ou FIE (5,9). A confirmação do diagnóstico por análise do DNA é um passo essencial para determinar o prognóstico e a terapia adequada (5).

As TS continuam a ser o tratamento mais comum para as formas severas das talassemias, sendo que a sua frequência e requerimentos variam consoante a severidade (4). O objetivo das TS é manter uma Hb pré-transfusão de 9-10,5 g/dL e minorar as manifestações clínicas das talassemias (10). Os indivíduos com talassemias apresentam uma absorção aumentada de ferro que, juntamente com as TS, levam a uma acumulação excessiva de ferro no organismo, responsável pela maioria das complicações em doentes com talassemia (10,11). Deste modo, os doentes com talassemias, em especial aqueles que recebem TS, necessitam de realizar a quelação de sangue, com o objetivo de diminuir a quantidade de ferro nos tecidos do organismo (10).

A melhor abordagem às talassemias é a sua prevenção através de campanhas de informação e esclarecimento da população e da realização de diversos rastreios, nomeadamente o rastreio pré-matrimonial, o rastreio pré-natal e ainda o diagnóstico pré-implantação para casais com dificuldades em conceber (5,12). O TMO é, atualmente, o único método de cura definitivo para as talassemias, no entanto, estão a ser desenvolvidas novas formas de tratamento como a modulação da expressão da síntese de Hb F e a terapia génica (10,11).

### **3. Objetivos**

Esta monografia foi elaborada no seguimento do trabalho desenvolvido na unidade curricular (UC) de Projeto III, em que tive oportunidade de realizar uma formação no contexto do trabalho no âmbito das hemoglobinopatias no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). Deste modo, o objetivo inicial da monografia é o desenvolvimento dos conhecimentos previamente adquiridos, dando maior ênfase às talassemias. O segundo objetivo da monografia é a compilação de informação atual e relevante sobre a etiologia, fisiopatologia, diagnóstico e abordagens terapêuticas das talassemias e a sua importância para a saúde pública.



## 4. Materiais e métodos

Para a realização desta monografia foi necessário consultar diferentes tipos de materiais de diversas fontes. Inicialmente, realizou-se uma pesquisa mais intensiva em livros da área de hematologia, com destaque nas hemoglobinopatias e talassemias. Esta pesquisa serviu para adquirir conhecimentos fundamentais desta temática e para estruturar a monografia. Seguidamente, iniciou-se uma pesquisa mais intensiva de artigos científicos disponibilizados pelo Pubmed, cuja informação foi considerada credível e pertinente. As palavras-chave mais utilizadas foram “ *$\alpha/\beta$  thalassemia*”, “*hemoglobinopathies*”, “*haemoglobin*” e “*thalassemia etiology/diagnosis/therapy/epidemiology/iron chelation*”. Aplicou-se um critério de exclusão aos artigos resultantes desta pesquisa: os artigos tinham que ser publicados em inglês. Para a obtenção de informação mais específica consultaram-se as páginas eletrônicas oficiais de organizações, nacional e internacionalmente reconhecidas e, da informação disponibilizada pelas mesmas, nomeadamente, a Direção Geral de Saúde (DGS), a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), entre outras.

## 5. Hemoglobina

### 5.1. Estrutura e Função

A Hb é uma metaloproteína constituída por um componente proteico, formado por quatro cadeias polipeptídicas – globinas, e um grupo prostético, designado por grupo heme constituído por uma porfirina ligada a um ião de ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ). As cadeias polipeptídicas perfazem um total de 574 aminoácidos e estão organizadas em duas cadeias de  $\alpha$  globina e duas cadeias de  $\beta$  globina, sendo que cada globina está ligada a um grupo heme (1,13).

A Hb é indispensável à vida humana e é responsável por várias funções fundamentais, nomeadamente o transporte de oxigénio ( $\text{O}_2$ ) dos pulmões para as células, o transporte direto e indireto do dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) produzido pelas células até aos pulmões e ainda possui um efeito tampão importante na manutenção do pH nos GV e no sangue (1). Os GV contêm cerca de 640 milhões de moléculas de Hb. O grupo heme é fundamental para o transporte do oxigénio enquanto que as cadeias globínicas protegem o grupo heme contra a oxidação, tornam a molécula solúvel e permitem a variação da afinidade ao  $\text{O}_2$  (1,14).

A Hb é uma molécula alostérica com capacidade de alternar entre duas estruturas quaternárias diferentes (oxihemoglobina e desoxihemoglobina), sendo que esta alteração é responsável pela curva sigmoide de dissociação do  $\text{O}_2$  – figura 1. A Hb liga-se ao  $\text{O}_2$  de forma cooperativa, ou seja, as quatro cadeias de globina estão relacionadas entre si, de forma que, quando um grupo heme é oxigenado, torna-se mais provável a oxigenação dos restantes grupos heme (1,13).

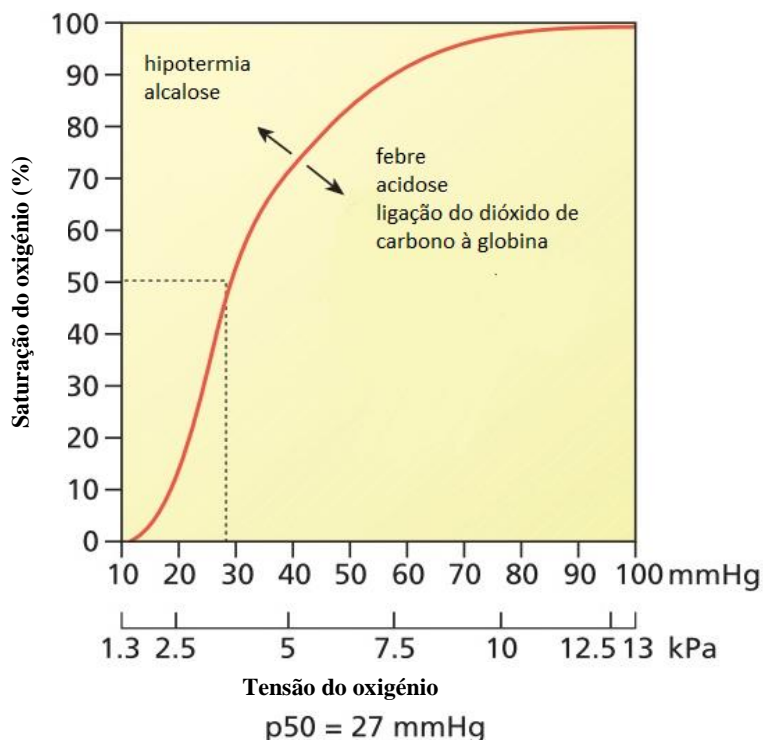


Figura 1- Curva de dissociação do oxigênio, indicando os efeitos do pH e a temperatura corporal. Adaptado de (1)

Todas as Hb normais são tetrâmeros de dois pares de cadeias de globina diferentes, um par de cadeias de globina tipo  $\alpha$  (cadeia de  $\alpha$  e zeta ( $\zeta$ ) globina) e um par de cadeias de globina tipo  $\beta$  (cadeia de  $\beta$ , delta ( $\delta$ ), gama ( $\gamma$ ) ou épsilon ( $\epsilon$ ) globina). A Hb A possui cadeias de  $\alpha$  globina conjugadas com cadeias de  $\beta$  globina (Hb A,  $\alpha_2\beta_2$ ) ou com cadeias de  $\delta$  globina (Hb A<sub>2</sub>,  $\alpha_2\delta_2$ ), e a Hb F possui cadeias de  $\alpha$  globina conjugadas com cadeias de  $\gamma$  globina (Hb F,  $\alpha_2\gamma_2$ ). Por outro lado, no embrião, as cadeias de  $\zeta$  globina, conjugam com cadeias de  $\gamma$  globina (Hb Portland,  $\zeta_2\gamma_2$ ) ou com as cadeias de  $\epsilon$  globina (Hb Gower 1,  $\zeta_2\epsilon_2$ ), e a conjugação de cadeias de  $\alpha$  globina e de  $\epsilon$  globina dá origem à Hb Gower 2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) (2,15).

Existem 2 espécies de Hb F, designadas  $^G\gamma$  e  $^A\gamma$ , com o aminoácido glicina e alanina na posição 136 da cadeia de  $\gamma$  globina, respetivamente. A Hb F, tal como o seu nome indica, é a Hb predominante durante o período fetal, variando entre 60 a 95% nos recém-nascidos (1). A Hb F está presente durante os primeiros 6 meses de vida, pelo que os bebés não desenvolvem  $\beta$  talassemia *major* após o nascimento, mas sim mais tarde, entre os 6 e os 12 meses (2,16). No adulto, a Hb presente em maior quantidade é a Hb A que representa 96-98% do total de Hb, seguida da Hb A<sub>2</sub> com 2,0-3,5% e da Hb F com um valor aproximado de 1% (1,15).

## 5.2. Síntese da Hb e genes globínicos

A síntese de Hb ocorre nos precursores eritroides, desde o proeritroblasto até ao reticulócito, não ocorrendo nos GV maduros. Para a síntese do heme são necessárias 8 enzimas, sob controlos genéticos distintos, sendo que a primeira reação enzimática e as últimas três ocorrem na mitocôndria e as quatro reações enzimáticas intermediárias ocorrem no citosol (1). Como toda a Hb normal é um tetrâmero de dois pares de cadeias de globina, a produção de cadeias de globina tipo  $\alpha$  e de cadeias de globina tipo  $\beta$  é equilibrada em todas as etapas de desenvolvimento. Devido à síntese de diferentes tipos de globinas em diferentes etapas da vida humana, assim altera-se em cada período de vida o tipo maioritário de Hb presente nos GV – período fetal, neonatal e vida adulta. No período embrionário ocorre a síntese de Hb específicas nomeadamente, a Hb Gower 1, Hb Gower 2 e Hb Portland, sendo que estas possuem cadeias de globina produzidas unicamente durante o período embrionário – cadeias de  $\zeta$  e de  $\epsilon$  globina. Na 5ª semana de gestação os eritroblastos primitivos presentes no saco vitelino começam a produzir as cadeias de  $\zeta$  e  $\epsilon$  globina e, a partir da 6ª semana, começam a sintetizar as cadeias de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  globina. A produção da Hb F e, posteriormente, da Hb A, inicia-se no fígado e no baço a partir da 10ª-12ª semana de gestação. Por fim, durante o último estadió de gestação, a medula óssea assume o papel principal de síntese das Hb, com um aumento da síntese de Hb A. Durante a vida adulta a medula óssea é responsável pela produção da Hb (1). Na figura 2 estão representados os órgãos onde ocorre a hematopoiese ao longo da ontogenia, bem como a síntese das diferentes cadeias de globina.

A síntese das cadeias de globina é regulada por genes localizados em dois agrupamentos génicos, localizados nos cromossomas 11 e 16. Os genes responsáveis pela síntese de cadeias de  $\alpha$  globina (*HBA*) encontram-se no agrupamento génico da  $\alpha$  globina no cromossoma 16 e os genes responsáveis pela síntese de cadeias de  $\beta$  globina (*HBB*) estão localizados no agrupamento génico da  $\beta$  globina no cromossoma 11. Em adição aos genes funcionais, cada agrupamento contém pseudogenes, que são homólogos não funcionais dos genes *HBA* e *HBB*, sendo que estes são transcritos, mas não traduzidos (1,13). Os genes responsáveis pela síntese das cadeias de globina estão ordenados no cromossoma, de acordo com a ordem sequencial segundo a qual são expressados durante o desenvolvimento. A ativação e o silenciamento sequencial dos genes responsáveis pela síntese das cadeias de globina são controlados rigorosamente (2). A sua regulação reflete

a ativação sequencial na direção 5'-3'. No entanto, ainda não é totalmente compreendida a forma como ocorre a comutação da expressão destes genes (15).

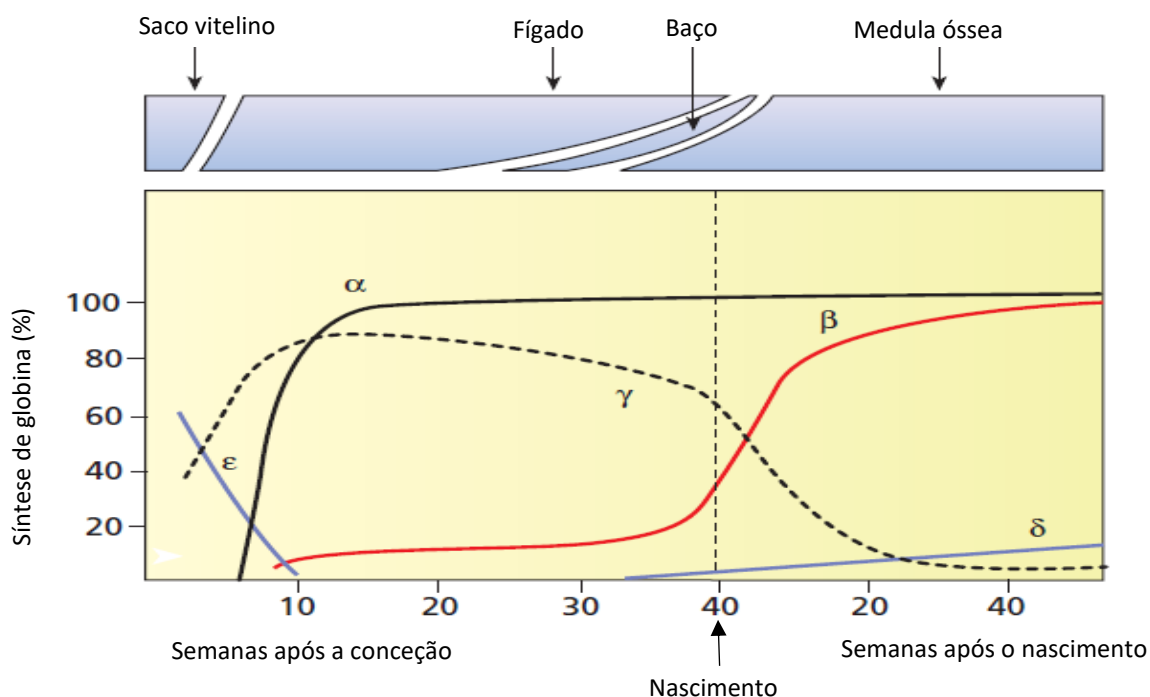


Figura 2- Representação esquemática dos locais e proporção de síntese das diferentes cadeias de globina no período embrionário, fetal e adulto. Adaptado de (1)

### 5.3. Agrupamento gênico da alfa globina

Cada cromossoma 16 tem dois genes *HBA* (*HBA1* e *HBA2*), que estão alinhados um após o outro no cromossoma. Como cada célula possui 2 cromossomas 16 homólogos, existe um total de 4 genes *HBA* em cada célula. Deste modo, cada um dos genes *HBA* é responsável pela síntese de 25% das cadeias de  $\alpha$  globina necessárias para a síntese de Hb (13). O agrupamento gênico da  $\alpha$  globina possui mais de 28 kb e contém, um gene embrionário  $\zeta$ , dois genes *HBA* (*HBA1* e *HBA2*), dois pseudogenes ( $\psi\zeta1$  e  $\psi\alpha1$ ) e dois genes *minor* tipo globina ( $\psi\alpha2$  e  $\theta$ ), estando dispostos na seguinte ordem: 5'- $\zeta2$ - $\psi\zeta1$ - $\psi\alpha2$ - $\psi\alpha1$ - $\alpha2$ - $\alpha1$ - $\theta$ -3'. O maior elemento de regulação do agrupamento gênico da  $\alpha$  globina é o HS-40 (1,2). A troca da síntese dos genes no agrupamento gênico da  $\alpha$  globina é relativamente simples. Os dois genes *HBA* são expressados de forma contínua ao longo da vida exceto durante as primeiras 6 semanas de embriogénese durante as quais a  $\zeta$  globina é sintetizada (5). O esquema do agrupamento gênico da  $\alpha$  globina está representado na figura 3 (A) (17,18).

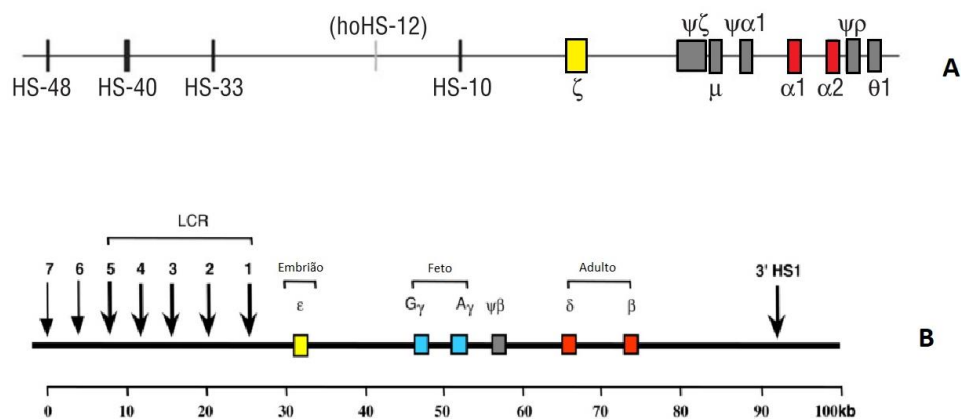


Figura 3- Representação do agrupamento gênico da alfa globina ( $\alpha$ ) e da beta globina ( $\beta$ ). Adaptado de (17,18)

#### 5.4. Agrupamento gênico da beta globina

Cada célula contém dois genes *HBB*, um em cada cromossoma 11 homólogo. Os dois genes *HBB* expressam  $\beta$  globina em proporção correspondente à quantidade de  $\alpha$  globina produzida pelos quatro genes *HBA* (13). O agrupamento gênico da  $\beta$  globina contém um gene embriônico  $\epsilon$ , dois genes fetais ( $G\gamma$  e  $A\gamma$ ), um pseudogene ( $\psi\beta$ ) e dois genes adultos ( $\delta$  e  $\beta$ ), que estão dispostos na seguinte ordem:  $5'-\epsilon-G\gamma-A\gamma-\psi\beta-\delta-\beta-3'$ . A *locus control region* (LCR) é a mais importante região regulatória *upstream*. O LCR estabelece um domínio transcricionalmente ativo que abrange todo o agrupamento gênico da  $\beta$  globina (2,15). A comutação da expressão dos genes no agrupamento gênico da beta globina é mais complexa. Consiste na permuta da síntese de cadeias de globina:  $\epsilon \rightarrow \gamma \rightarrow \beta$  (2). O esquema do agrupamento gênico da  $\beta$  globina está representado na figura 3 (B) (17,18).

## 6. Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias são doenças hereditárias, de transmissão autossômica recessiva que envolvem alterações na Hb, causadas por mutações nos genes responsáveis pela síntese das cadeias de globina ou nas suas regiões regulatórias. As hemoglobinopatias podem dividir-se em duas categorias – estruturais (qualitativas), em que as mutações alteram a sequência de aminoácidos e é sintetizada uma hemoglobina anormal, e quantitativas onde se integram as talassemias, em que a síntese das cadeias de globina está reduzida ou ausente (1,2).

As hemoglobinopatias são causadas por mutações pontuais, fusão de genes, deleções e mutações que alteram um codão STOP numa sequência codificante ou que transformam uma sequência codificante num codão STOP. As mutações nos genes das globinas nem sempre originam efeitos adversos para a saúde humana, uma vez que o código genético é redundante e a mutação pode dar origem a um novo codão que codifica para o mesmo aminoácido. Por outro lado, algumas mutações estruturais da Hb vão alterar as propriedades da mesma, conduzindo a uma alteração da afinidade para com o oxigénio, tornando-a mais instável, mais facilmente polimerizável ou mais suscetível à oxidação. Se a mutação ocorrer nos genes *HBB*, origina uma Hb A variante, se pelo contrário, a mutação ocorrer nos genes *HBA* vai dar origem a Hb F, Hb A e Hb A<sub>2</sub> variantes. As mutações nos genes que codificam as globinas  $\delta$  (*HBD*) e  $\gamma$  (*HBG*) vão levar à formação de HbA<sub>2</sub> e Hb F variantes, respetivamente (1).

Já foi reconhecido que as hemoglobinopatias, tal como as talassémias e a drepanocitose, são um problema de saúde global cada vez mais sério (6,19). Recentemente, e pela primeira vez, as hemoglobinopatias de carácter hereditário foram incluídas na última versão do *Global Burden of Disease Program* e foram definidas como fatores contributivos *major* na carga global de anemia (19,20).

## 7. Talassemias

### 7.1. Classificação

As talassemias são doenças hereditárias que resultam em diferentes níveis de anemia devido à hemólise e eritropoiese ineficaz causadas pela alteração da produção das cadeias de globina, reduzindo a funcionalidade da Hb em indivíduos com esta condição (16). A sua transmissão hereditária, autossômica e recessiva permite que os portadores de talassemia sejam clinicamente normais. No entanto, quando ambos os pais são portadores, em cada gravidez, há 25% de probabilidade que a criança tenha talassemia, 50% de probabilidade que seja portadora de talassemia e 25% de probabilidade que venha a ser normal. As talassemias são causadas por dois tipos de defeitos nos genes responsáveis pela síntese de globina: erros de deleção e erros de não deleção. O alcance dos erros de deleção normalmente envolve mais do que 1 kb. Os erros de não deleção consistem em substituições de um nucleótido ou deleções/inserções de oligonucleótidos (2).

De acordo com a severidade clínica, as talassemias dividem-se geralmente em três grupos:

1. Talassemia *Minor* ou Portadores: os portadores são muitas vezes assintomáticos e não necessitam de qualquer tratamento. Corresponde ao traço  $\alpha$  ou  $\beta$  talassémico.
2. Talassemia *Intermédia*: ocorre anemia moderada (Hb 6-10 g/dL) e, ocasionalmente, é necessário realizar TS. Corresponde à doença da Hb H e  $\beta$  talassemia intermédia.
3. Talassemia *Major*: ocorre anemia severa e são necessárias TS para sobreviver. Corresponde à hidropisia fetal de Bart e à  $\beta$  Talassemia *major* (2).

A talassemia é causada pela síntese reduzida de  $\alpha$  ou  $\beta$  subunidades e subsequente desequilíbrio das cadeias tipo  $\alpha$  globina: tipo  $\beta$  globina. Na Hb normal o rácio de cadeias de globina tipo  $\alpha$ : tipo  $\beta$  é de 1:1. Este desequilíbrio entre as cadeias de globina é um dos aspetos mais importantes para a fisiopatologia da talassemia (2). De acordo com a síntese ineficaz da(s) cadeia(s) de globina, assim as talassemias são classificadas em  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta\beta$  e  $\epsilon\gamma\delta\beta$  talassemias (15). Na  $\alpha$  talassemia, a quantidade de  $\beta$  globinas é muito superior à quantidade de  $\alpha$  globinas, pelo contrário, na  $\beta$  talassemia, a quantidade de  $\alpha$  globinas é muito superior à quantidade de  $\beta$  globinas. A severidade do fenótipo é proporcional ao grau do desequilíbrio, que é determinado pelo correspondente genótipo (2). A figura 4 demonstra a relação entre o desequilíbrio da síntese de globinas e a respetiva talassemia.



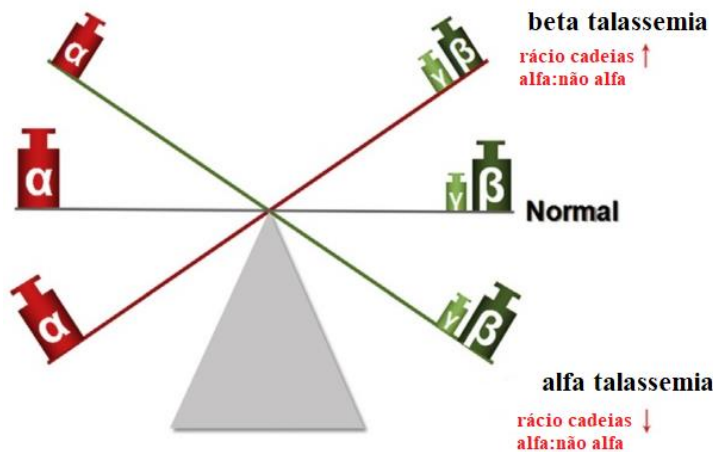


Figura 4- Fisiopatologia das talassemias. Adaptado de (2)

## 7.2.Epidemiologia

As alterações hereditárias da Hb são as doenças, a nível hematológico, mais comuns no mundo e representam cerca de 3,4% das mortes em crianças menores de 5 anos (2,21). Estima-se que 1-5% da população mundial é portadora de uma mutação talassémica, tornando a talassemia a doença de transmissão hereditária recessiva mais comum do mundo (4).

As talassemias são prevalentes em zonas tropicais e subtropicais onde a malária foi e continua a ser endêmica. A alta frequência de talassemias pode estar relacionada com a maior sobrevivência dos portadores quando contagiados com a malária (2). Existem extensas provas científicas que evidenciam a elevada frequência de hemoglobinopatias, comparativamente com outras doenças monogénicas, em regiões onde a malária é endêmica, o que reflete a seleção natural devido à resistência relativa que os portadores de hemoglobinopatias possuem contra a malária causada pelo *Plasmodium falciparum*. Outros fatores, que contribuem para a manutenção da elevada frequência genética das talassemias na população, incluem a prática generalizada de casamentos consanguíneos, que podem ser praticados por até 25% da população mundial e o aumento da idade maternal. Mesmo que a transmissão de malária seja reduzida de forma significativa, serão necessárias várias gerações para que haja um efeito significativo na taxa de portadores de talassemias (22).

Os portadores de talassemias estão localizados sobretudo no Sudeste Asiático, na zona do Mediterrâneo, no subcontinente indiano, no Médio Oriente e em África (15). No entanto, devido a fenómenos de migração, a talassemia já não está limitada às zonas tradicionais de alta prevalência e, é considerada, atualmente, um problema de saúde comum no Norte dos Estados Unidos da América, no Norte da Europa e na Austrália (2).

As formas mais ligeiras de  $\alpha$  talassemia estão presentes entre 10% a 20% da população em algumas zonas de África, 40% no Médio Oriente e Índia e até 80% na zona da Papua Nova Guiné e Norte da Índia – figura 5. As formas mais severas de  $\alpha$  talassemia são altamente prevalentes em regiões específicas no Sudeste Asiático e da bacia do Mediterrâneo – figura 5. A  $\beta$  talassemia tem uma prevalência de 1% em regiões ao longo de África, o Mediterrâneo, o Médio Oriente, o subcontinente indiano e o Sudeste Asiático – figura 6 (16,23).

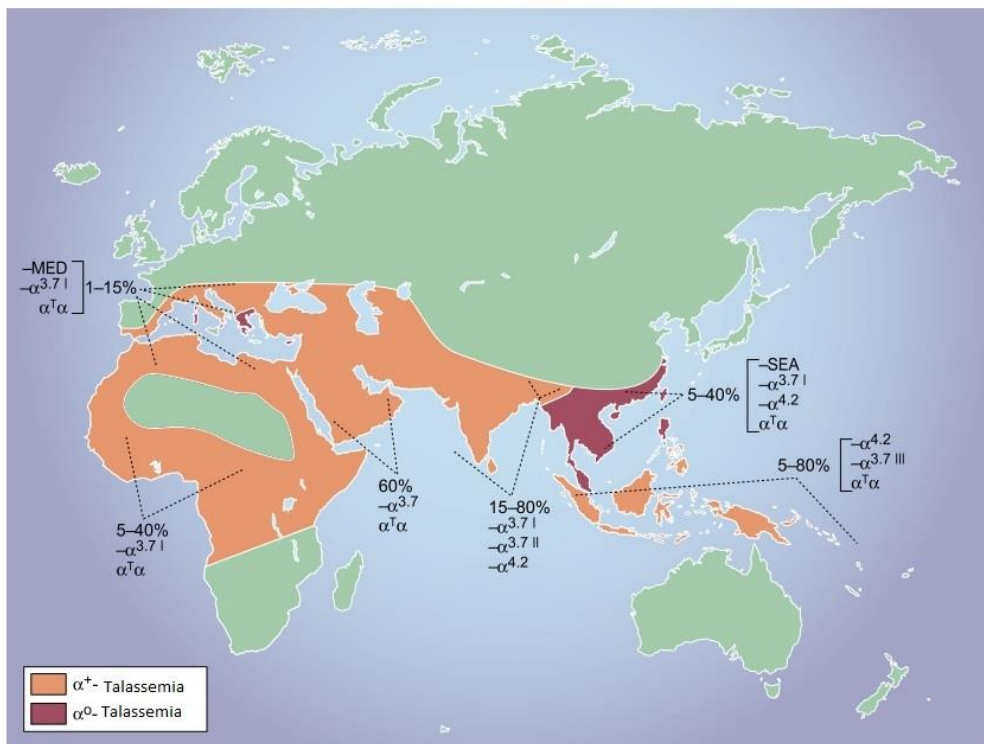


Figura 5- Distribuição global das mutações de alfa talassemia. Adaptado de (15)

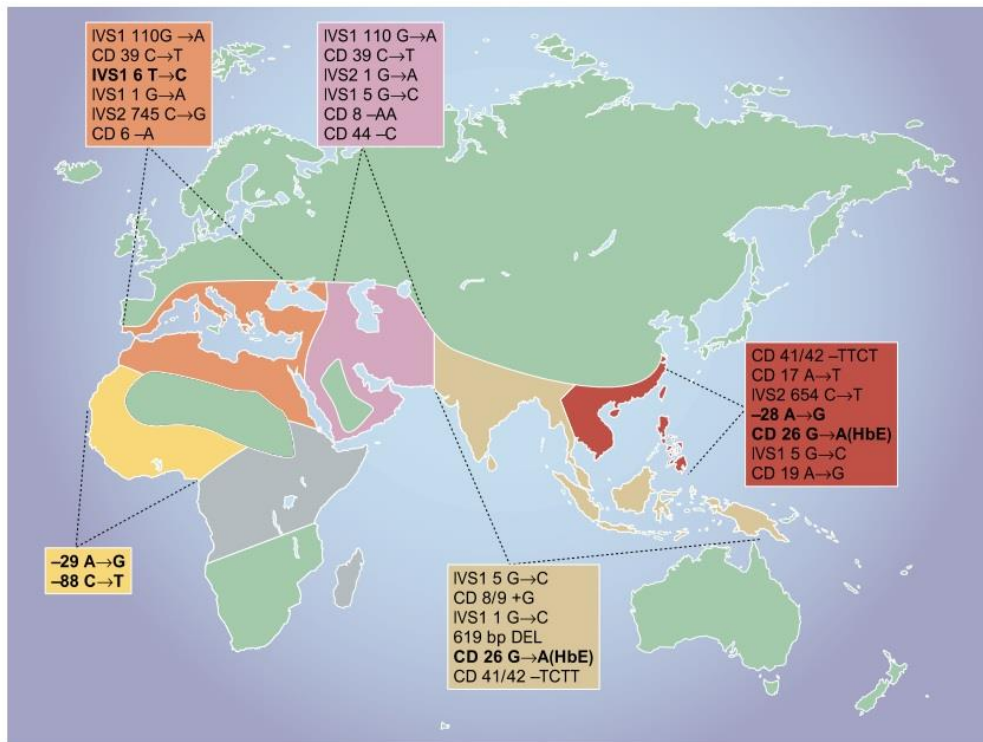


Figura 6- Distribuição global das mutações de beta talassemia. Adaptado de (15)

Entre 1983 e 1985, realizou-se um estudo epidemiológico na população portuguesa, observando-se uma frequência média de portadores de  $\beta$  talassemia de 0,45% e de portadores de Hb S de 0,32%. No sul de Portugal encontramos uma prevalência mais elevada de hemoglobinopatias com 1,57% de portadores de  $\beta$  talassemia em Évora, e 1,11% de portadores de Hb S em Beja. A prevalência da  $\beta$  talassemia é superior a 5% em determinadas zonas, nomeadamente na bacia do rio Mira e no Barlavento Algarvio (7,24). A prevalência da drepanocitose e da  $\beta$  talassemia em Portugal é superior no centro e sul do país e com uma frequência conjunta de portadores de 8,9% (8).

## 8. Alfa Talassemia

A  $\alpha$  talassemia resulta da diminuição da síntese da cadeia de  $\alpha$  globina, sendo que esta é codificada por quatro genes distintos ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ), dois genes (*HBA1* e *HBA2*) em cada cópia do cromossoma 16 homólogo (1). Deste modo, um total de 4 genes, codifica para a síntese de  $\alpha$  globina. Mais de 128 mutações, a maioria deleções, estão associados à  $\alpha$  talassemia (16,25). Considerando o haplotipo ( $\alpha\alpha/$ ), as mutações da  $\alpha$  talassemia podem ser classificadas em três grupos:

1.  $\alpha^+$  talassemia – deleção ( $-\alpha/$ ): remoção de um único gene *HBA*.
2.  $\alpha^0$  talassemia – deleção ( $--/$ ): remoção de ambos os genes *HBA*.
3.  $\alpha^T\alpha/$  ou  $\alpha\alpha^T/$  talassemia – mutação não deletional do gene *HBA2* ou *HBA1*, respetivamente (16).

O gene *HBA2* é responsável por dois terços da síntese total da cadeia de  $\alpha$  globina, enquanto que o gene *HBA1* é responsável pelo restante um terço. Desta forma, as mutações localizadas no gene *HBA2* dão origem a consequências muito mais severas que as mutações no gene *HBA1*. Adicionalmente, as mutações não deletionais dão origem a reduções da cadeia de  $\alpha$  globina mais graves que as deleções  $\alpha^+$ , pelo que, de acordo com o haplotipo, é possível estabelecer uma ordem, de severidade crescente, das mutações nos genes *HBA* baseada nos efeitos relativos na produção de  $\alpha$  globina:  $\alpha\alpha^T/ < -\alpha/ < \alpha^T\alpha/ < --/$  (2).

Mais de 40 mutações deletionais  $\alpha^0$  diferentes foram identificadas, sendo as mais comuns a mutação  $-\text{SEA}$  (Sudeste Asiático) e  $-\text{MED}$  (Mediterrâneo) (2,26). Outro tipo de mutações raras que origina a  $\alpha^0$  talassemia é a remoção da região regulatória HS-40, não interferindo com os genes *HBA* (2,25). Foram reportadas mais de 10  $\alpha^+$  deleções; as deleções  $-\alpha^{3,7}$  e  $-\alpha^{4,2}$  são as mais comuns a nível mundial (15,26,27). Estas deleções são o resultado de recombinação recíproca e também podem originar  $\alpha$ -triplicação  $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}$  e  $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}4,2}$ . Se ocorrerem mais recombinações é possível aparecerem genes *HBA* quadruplicados ( $\alpha\alpha\alpha\alpha$ ) ou quintuplicados ( $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ ) (2). Pelo menos 90 mutações não deletionais já foram encontradas, incluindo mutações que afetam o processamento do mRNA, a tradução do mRNA e a estabilidade da  $\alpha$  globina. Algumas variantes de Hb que causam fenótipos similares às talassemias foram também classificadas dentro deste grupo, tal como, a Hb Constant Spring (Hb CS,  $\alpha^{\text{CS}}\alpha$ ) e a Hb Quong Sze (Hb QS,  $\alpha^{\text{QS}}\alpha$ ) (2,25). Dentro das mutações não deletionais atualmente conhecidas, as mais comuns são

Talassemias: Etiologia, Fisiopatologia, Diagnóstico e Abordagens Terapêuticas

as mutações  $\alpha^{IVS1(-5nt)}\alpha$  no Mediterrâneo,  $\alpha^{PA(AATAAG)}\alpha$  no Leste Asiático e  $\alpha^{Constant Spring}\alpha$  no Sudeste Asiático (2,25–27).

Na  $\alpha$  talassemia o fenótipo aumenta de severidade com o número de genes *HBA* não funcionais (2). A deleção ou disfunção de um destes genes pode levar a uma condição assintomática sem relevância clínica, por outro lado, a deleção dos quatro genes *HBA* dá origem à hidropisia fetal de Bart, condição normalmente incompatível com a vida. Deste modo, dependendo do número de genes deletado ou inativos, assim varia a intensidade dos efeitos patológicos, dando origem a quatro tipos de  $\alpha$  talassemias diferentes (1). As 4 condições clínicas de severidade crescente estão representadas na figura 8: portador silencioso de  $\alpha$  talassemia,  $\alpha$  talassemia *minor*, doença da Hb H e hidropisia de Bart (2).

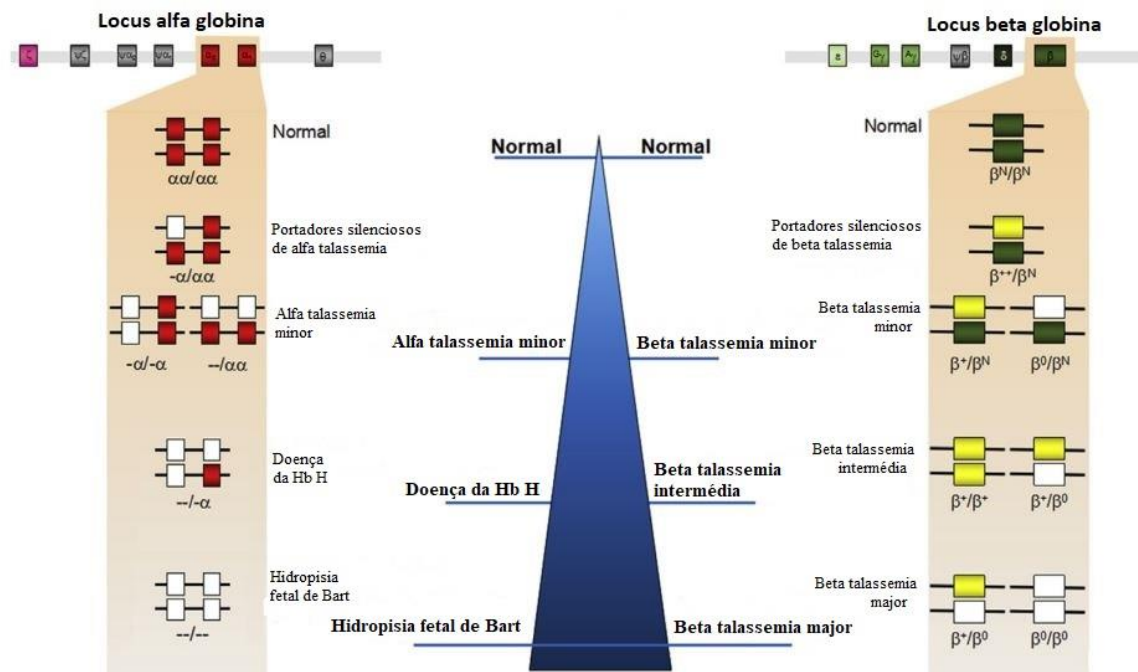


Figura 7- Classificação clínica e correlação genótipo-fenótipo da alfa (direita) e beta (esquerda) talassemia. Adaptado de (2)

### **8.1. Portador Silencioso de Alfa Talassemia, (- $\alpha$ / $\alpha\alpha$ )**

Os portadores silenciosos de  $\alpha$  talassemia, também considerada  $\alpha^+$  talassemia, sofreram uma deleção de um gene *HBA* e são, de forma geral, fenotipicamente silenciosos, apresentando ligeira ou nenhuma anemia, podendo ocorrer microcitose e hipocromia (2,25). Estes casos são clínicamente e hematologicamente normais, não sendo geralmente detectados em análises de rotina (contagem total de sangue e análise de Hb) com base no fenótipo hematológico e, só podem ser identificados por testes de genotipagem (2). Tipicamente, esta condição não tem impacto clínico, mas pode ter implicações para os descendentes. Na população afro-americana a deleção  $\alpha^{-3,7\text{kb}}$  é a deleção  $\alpha$  mais comum (16).

### **8.2. Alfa talassemia *minor*, (- $\alpha$ / $\alpha$ ) ou (--/ $\alpha\alpha$ )**

A  $\alpha$  talassemia *minor* ou traço alfa talassémico, caracterizado por duas deleções dos genes *HBA*, é geralmente assintomática e apresenta uma anemia microcítica e hipocrômica ligeira. As duas deleções podem ocorrer na forma *trans* ( $\alpha^+$  talassemia homocigótica,  $\alpha^-/\alpha^-$ ) muito comum na população africana, e na forma *cis* ( $\alpha^0$  talassemia,  $\alpha\alpha/--$ ) típica das populações asiáticas (2,3,25). A forma *cis* tem implicações significativas para a descendência devido ao risco elevado de hidropisia fetal de Bart. Portadores de mutações não deletionais ( $\alpha\alpha^T/\alpha\alpha$ ) apresentam fenótipos hematológicos diversos, variando entre o estado de portador silencioso ( $\alpha^{\text{Westmead}}\alpha$ ) ao estado de  $\alpha$  talassemia *minor* ( $\alpha^{\text{CS}}\alpha/\alpha\alpha$  ou  $\alpha^{\text{QS}}\alpha/\alpha\alpha$ ) (2). Indivíduos com  $\alpha$  talassemia *minor* são na sua maioria assintomáticos e são identificados durante um *check-up* médico ou durante um rastreio neonatal. Caso ocorra anemia sintomática, é necessário eliminar outras causas de anemia concomitante, como a deficiência em ferro (16).

### **8.3. Doença da Hb H, (--/ $\alpha$ )**

A Hb H é um tetrâmero composto por cadeias de  $\beta$  globina devido ao excesso de cadeias de  $\beta$  globina face à síntese muito reduzida de cadeias de  $\alpha$  globina (1). A doença da Hb H é a forma mais severa de  $\alpha$  talassemia, resultando da deleção de 3 dos 4 genes *HBA* (composto heterocigótico  $\alpha^+/\alpha^0$ ,  $-\alpha/--$ ) (16). No entanto, alguns casos de doença de Hb H são devidos a homocigotia ou heterocigotia composta por ocorrência de mutações não deletionais nos genes *HBA*, tal como,  $\alpha^{\text{CS}}\alpha/\alpha^{\text{CS}}\alpha$ ,  $\alpha^{\text{QS}}\alpha/\alpha^{\text{QS}}\alpha$  ou  $\alpha^{\text{CS}}\alpha/\alpha^{\text{QS}}\alpha$ . Os indivíduos

que são afetados pela deleção dos 3 genes *HBA* sofrem de “doença da Hb H deletional”, enquanto que os indivíduos afetados pela deleção  $\alpha^0$  e por uma mutação não deletional sofrem de “doença da Hb H não deletional”. Tradicionalmente, a doença da Hb H não deletional é considerada mais severa que a sua forma deletional, particularmente o genótipo  $--/\alpha^{CS}\alpha$ , também conhecido como Hb H CS. Doentes com Hb H CS têm um fenótipo clínico mais severo que outros doentes com doença da Hb H (2). A doença da Hb H é caracterizada por anemia microcítica, hipocrômica e hemolítica, moderada a severa, e níveis de Hb entre 8-10 g/dL (2,16). A acumulação da Hb H é responsável pela hemólise porque, embora a Hb H seja solúvel, esta é relativamente instável, e precipita à medida que os GV envelhecem, formando corpos de inclusão que danificam os GV e reduzem o seu tempo de vida útil (3). No entanto, a severidade da anemia é variável, dependendo da anomalia molecular, com a Hb a variar desde 2,6 a 13,3 g/dL. É característico da doença da Hb H níveis variados de icterícia, sinais de atrasos de crescimento nas crianças e hepatoesplenomegalia; o hiperesplenismo é reportado ocasionalmente. Outras complicações incluem úlceras nas pernas e cálculos biliares. A anemia pode piorar devido à deficiência de ácido fólico, infeções agudas ou o uso de drogas (16,25). O excesso de ferro causado pelo aumento da sua absorção intestinal e/ou por transfusões, muitas vezes não é diagnosticado em doentes com Hb H (16).

O tratamento da doença da Hb H inclui suplementação crónica de ácido fólico (1-5 mg/d). TS intermitentes podem estar indicadas em episódios de hemólise aguda, nomeadamente durante infeções, gravidez ou uso de drogas (28). Indivíduos com apresentações mais severas de Hb H podem necessitar de TS crónicas ou esplenectomia para minorar atrasos do crescimento, esplenomegalia e hiperesplenismo (16).

#### **8.4. Hidropisia fetal de Bart, (--/--)**

A síndrome de hidropisia fetal de Bart é causada pela ausência de genes *HBA* ( $\alpha^0$  talassemia homozigótica, --/--), não havendo qualquer síntese de cadeias de  $\alpha$  globina e, como tal, não há a formação de Hb A, Hb A<sub>2</sub> e Hb F (16,25). A Hb de Bart é um tetrâmero de quatro cadeias de  $\gamma$  globina e, é ineficaz como transportador de oxigénio devido à sua elevada afinidade ao mesmo, similar à afinidade da mioglobina, que não liberta o oxigénio para os tecidos em condições fisiológicas. Deste modo, os fetos e os recém-nascidos não possuem Hb F nem Hb A e contêm, na sua maioria, Hb de Bart, sofrem de hipoxia severa,

que resulta em hidropisia fetal (3). Esta condição é geralmente incompatível com a vida extrauterina (1). A hidropisia fetal de Bart é caracterizada por anemia intrauterina severa, insuficiência cardíaca, hepatoesplenomegalia, deformidades cardiovasculares e esqueléticas, mau desenvolvimento do cérebro e aumento da placenta que, se não for corrigido com transfusões intrauterinas, resulta em morte intrauterina entre as 23 e 38 semanas de gestação ou imediatamente após o nascimento (16,25).



## 9. Beta Talassemia

A  $\beta$  talassemia é caracterizada por síntese ineficaz de cadeias de  $\beta$  globina que dá origem a um desequilíbrio da produção de cadeias de globina e, a um excesso de  $\alpha$  globina. As cadeias de  $\alpha$  globina em excesso vão agregar-se nos precursores dos GV, ocorrendo a maturação de GV anormais e a sua destruição prematura na medula óssea (15). A síntese de cadeias de  $\beta$  globina é controlada por dois genes ( $\beta/\beta$ ), um gene *HBB* em cada cromossoma 11 (16). Já foram identificadas mais de 200 mutações diferentes nos genes *HBB* em doentes com  $\beta$  talassemia (15). Com a exceção de algumas mutações deletionais, que afetam os exões do gene *HBB*, tais como as mutações  $\beta^{\text{CD54-58}(-13\text{bp})}$  e  $\beta^{\text{CD89-93}(-14\text{bp})}$ , a maioria das alterações consiste em mutações pontuais ou pequenas deleções (perda de uma ou duas bases), o que interfere com a função do gene a nível da transcrição, tradução ou pós-tradução (2,15). Dependendo da redução da síntese de cadeias de  $\beta$  globina normais, as mutações  $\beta$  talassémicas são divididas em:

1.  $\beta^0$  talassemia – mutação ( $\beta^0$ ): não ocorre síntese de cadeias de  $\beta$  globina.
2.  $\beta^+$  talassemia – mutação ( $\beta^+$ ): ocorre uma redução severa da síntese de cadeias de  $\beta$  globina.
3.  $\beta^{++}$  talassemia – mutação ( $\beta^{++}$ ): ocorre uma redução ligeira da síntese de cadeias de  $\beta$  globina (2).

As  $\delta\beta$  e  $\epsilon\gamma\delta\beta$  talassemias são bastante raras, resultando de uma série de deleções que envolvem o agrupamento génico da  $\beta$  globina, removendo ou os genes *HBD* e *HBB* ou todos os genes do agrupamento génico. De forma similar, muitas formas da PHHF resultam de deleções deste agrupamento génico ou de mutações pontuais nos promotores do gene *HBG* (15).

A severidade da  $\beta$  talassemia está relacionada com o grau de desequilíbrio das cadeias de globina. As complicações mais importantes da  $\beta$  talassemia, tal como, a esplenomegalia, problemas esqueléticos e danos a nível endócrino e cardíaco, estão relacionadas com o grau de anemia, juntamente com a magnitude da sobrecarga de ferro nos tecidos, resultado da absorção aumentada de ferro e das repetidas TS. Como a severidade da anemia da  $\beta$  talassemia reflete o desequilíbrio da síntese das cadeias de globina, então tudo o que mudar a magnitude do excesso de cadeias de  $\alpha$  globina vai ter um efeito importante no fenótipo (15). A  $\alpha$  talassemia coexiste com a  $\beta$  talassemia com elevada frequência em muitas populações, não sendo incomum herdar ambas as condições (29). Deste modo,

homozigotos ou heterozigotos compostos para alelos severos de  $\beta$  talassemia podem ser, simultaneamente, homozigotos ou heterozigotos para  $\alpha^+$  talassemia ou heterozigotos para  $\alpha^0$  talassemia. Através de estudos dos fenótipos de indivíduos com estas condições, verificou-se que a co-herança de  $\alpha$  talassemia pode amenizar a severidade de  $\beta$  talassemia (15). Com efeito, a co-herança de diferentes alelos de  $\alpha$  talassemia pode reduzir a magnitude da severidade de homozigotos ou heterozigotos compostos de  $\beta^0$  talassemia e pode converter as formas mais severas de  $\beta$  talassemia em formas mais ligeiras, não dependentes de TS (15,30,31).

A variabilidade fenotípica da  $\beta$  talassemia manifesta-se numa magnitude que varia entre os quadros clínicos assintomáticos até fenótipos severos (16). Deste modo, a  $\beta$  talassemia pode ser dividida do ponto de vista clínico em quatro condições com graus de severidade crescente representados na figura 8: portador silencioso de  $\beta$  talassemia,  $\beta$  talassemia *minor*, talassemia intermédia e talassemia *major* (2).

### **9.1. Beta Talassemia *Minor*, ( $\beta^+/\beta$ ) ou ( $\beta^0/\beta$ )**

Os indivíduos com  $\beta$  talassemia *minor*, também conhecidos como portadores ou traço  $\beta$  talassémico, são geralmente assintomáticos, mas podem apresentar uma anemia microcítica e hipocrômica ligeira (16).

Os portadores silenciosos de  $\beta$  talassemia são heterozigóticos para a mutação  $\beta^{++}$  ( $\beta^{++}/\beta$ ) e os seus níveis de Hb A<sub>2</sub> e de GV estão muito próximos dos valores normais, só podendo ser identificados através de um diagnóstico molecular. Os alelos  $\beta^{++}$  não são muito frequentes exceto a mutação  $\beta^{-101(C>T)}$ , que é comum nas populações do Mediterrâneo (2).

A  $\beta$  talassemia *minor*, afeta indivíduos que herdaram um único alelo  $\beta^+$  ou  $\beta^0$  ( $\beta^+/\beta$  ou  $\beta^0/\beta$ ). Eles são assintomáticos, mas apresentam microcitose, hipocromia e níveis aumentados de Hb A<sub>2</sub> (2). A elevação da Hb A<sub>2</sub> é um elemento chave no diagnóstico (16).

## 9.2. Beta Talassemia Intermédia

A  $\beta$  talassemia intermédia é uma condição clínica cuja gravidade varia entre a  $\beta$  talassemia *minor* e a  $\beta$  talassemia *major* e engloba um espectro de fenótipos que vão desde anemia ligeira até anemia severa, necessitando de TS ocasionais. O hemograma apresenta valores de Hb entre 7 – 10 g/dL. A manifestação inicial de  $\beta$  talassemia intermédia geralmente começa numa idade mais avançada (mais do que 2 anos de idade) do que a manifestação de talassemia *major* (2).

A maioria dos indivíduos com  $\beta$  talassemia intermédia são geralmente homozigotos  $\beta^+$  ( $\beta^+/\beta^+$ ) ou heterozigotos compostos de  $\beta^+$  e  $\beta^0$  ( $\beta^+/\beta^0$ ). Indivíduos que são heterozigóticos para mutações dominantes de  $\beta$  talassemia ( $\beta^D/\beta$ ), homozigotos para  $\beta_0$  ( $\beta^0/\beta^0$ ) com co-herança de  $\alpha$  talassemia ou heterozigóticos para  $\beta^+$  ou  $\beta^0$  ( $\beta^+/\beta$  ou  $\beta^0/\beta$ ) com co-herança de triplicação  $\alpha$ , também demonstram um fenótipo de talassemia intermédia. No entanto, a correlação genótipo-fenótipo da  $\beta$  talassemia intermédia é tão complexa que a patogénese de alguns doentes continua inconclusiva e não pode ser explicada por mecanismos conhecidos (2).

É comum os indivíduos com  $\beta$  talassemia intermédia apresentarem anemia, hiperbilirrubinemia e hepatoesplenomegalia. As crianças apresentam anemia, atrasos no crescimento e desenvolvimento e complicações da hematopoiese extramedular, como deformidades faciais e ósseas (32). Estes indivíduos necessitam de monitorização regular e de iniciar TS frequentes para permitir um crescimento e desenvolvimento normal e, prevenir ou reduzir complicações a longo prazo (16,32).

A hematopoiese extramedular é um mecanismo compensatório da anemia crónica e resulta em deformidades faciais e ósseas, osteoporose com fraturas patológicas, esplenomegalia, hepatomegalia e formação de massas eritropoéticas, especialmente na coluna vertebral e no tronco. A esplenomegalia pode dar origem a hiperesplenismo com pancitopenia. As massas eritropoéticas podem causar problemas neurológicos, tal como, a compressão da medula óssea e paraplegia. Os indivíduos com  $\beta$  talassemia intermédia são propensos a desenvolverem cálculos biliares devido à hemólise crónica, e estão em risco de desenvolverem úlceras crónicas nas pernas, hipertensão pulmonar, e complicações trombóticas, nomeadamente, acidente vascular cerebral, trombose venosa profunda e embolismo pulmonar (16,32). O risco de hipertensão pulmonar e trombose está aumentado em doentes que foram esplenectomizados (16,33).

O desenvolvimento de sobrecarga de ferro, em indivíduos com talassemia intermédia que não realizam TS, ocorre porque a eritropoiese ineficaz conduz a um aumento da absorção de ferro no sistema gastrointestinal (16,34). Adicionalmente, as TS intermitentes, contribuem para a sobrecarga de ferro (16). Os indivíduos com  $\beta$  talassemia intermédia podem necessitar de TS intermitentes em fases de hemólise exacerbada ou diminuição da produção de GV, tal como, durante infeções agudas, deficiência de ácido fólico, infeções causadas pelo parvo vírus ou outras causas transientes (16,35,36). Deste modo, todos os doentes com  $\beta$  talassemia intermédia devem de ser avaliados e monitorizados, regularmente, para a sobrecarga de ferro, e a terapia de quelação deve de ser considerada quando for indicada (16).

As TS crónicas estão indicadas quando existe um atraso no crescimento e um desenvolvimento deficiente na infância, agravamento da anemia sem causas conhecidas e revertíveis, esplenomegalia e outras complicações da hematopoiese extramedular. As mudanças nos fenótipos clínicos da  $\beta$  talassemia intermédia estão relacionadas com o envelhecimento, refletindo-se no facto de que indivíduos com um fenótipo menos severo podem começar a manifestar complicações significativas, e a requerer o início de um programa de TS crónicas, durante a fase adulta (16,37). Os doentes diagnosticados com  $\beta$  talassemia intermédia podem ser reclassificados como tendo  $\beta$  talassemia dependente de TS, ou  $\beta$  talassemia *major*, se a sua necessidade de TS chegar a mais de 8 unidades de sangue por ano (16,35).

### **9.3. Beta Talassemia Major**

A talassemia *major* é a forma mais severa de  $\beta$  talassemia. As crianças têm entre 6 e 24 meses quando apresentam  $\beta$  talassemia *major*, após a transição da Hb F para a Hb A disfuncional (16,32,38). Os indivíduos afetados apresentam anemia severa hipocrômica e microcítica (Hb, <6 g/dL), hemólise, eritropoiese ineficaz e necessitam de TS regulares para sobreviver (16,32,35). Atrasos no desenvolvimento, palidez, problemas de alimentação, febre recorrente, irritabilidade e hepatoesplenomegalia são sintomas comuns nas crianças desde cedo (16,32). As crianças que não são tratadas, ou que são tratadas incorretamente para a  $\beta$  talassemia *major*, podem manifestar um atraso do crescimento, icterícia, palidez, hepatoesplenomegalia, massas eritropoéticas, úlceras nas pernas e

problemas a nível esquelético (16,32). Sem tratamento, estes indivíduos morrem na primeira ou segunda década de vida (16,38).

O início de um programa de TS crónicas, para manter uma Hb pré-transfusão entre 9,0–10,0 g/dL, nos estadios iniciais da doença, permite um crescimento e desenvolvimento normais. Na ausência de uma quelação eficaz, as crianças submetidas a um programa de TS vão desenvolver complicações derivadas da sobrecarga de ferro na segunda década de vida, incluindo fibrose no fígado, cardiomiopatia e disfunções endócrinas, nomeadamente, hipogonadismo, osteoporose, diabetes e hipotireoidismo (16,32,33). As doenças cardiovasculares devido à sobrecarga de ferro no coração são a causa de morte mais comum em indivíduos com  $\beta$  talassemia *major* (16).

A maioria dos casos de  $\beta$  talassemia *major* são homocigotos para  $\beta^0$  ( $\beta^0/\beta^0$ ) e uma pequena percentagem são heterocigotos compostos de  $\beta^+$  e  $\beta^0$  ( $\beta^+/\beta^0$ ) (2).

## 10. Variantes de Hb e outras Talassemias

Algumas variantes de Hb são sintetizadas a uma velocidade reduzida ou são altamente instáveis e dão origem a fenótipos similares à talassemia, tal como, a Hb E ( $\beta^{\text{CD}26(\text{G}>\text{A})}$ ). Esta mutação resulta numa substituição do aminoácido ácido glutâmico pela lisina, ativando, simultaneamente, um novo local de *splicing*, que causa um processamento anormal de mRNA. Esta mutação é normalmente considerada uma mutação  $\beta^+$  talassemia (2,15). A Hb E é a Hb variante mais comum no Sudeste Asiático, com uma frequência de portadores superior a 50% em determinadas regiões, sendo também prevalente em certas partes do subcontinente Indiano e na Tailândia (4,10). Os heterozigotos para a Hb E são clinicamente normais, apresentando numa eletroforese 20-30% de Hb E e ligeiras mudanças nos índices hematológicos. Os homozigotos para a Hb E são clinicamente silenciosos e podem apresentar uma anemia ligeira. O esfregaço de sangue destes indivíduos apresenta uma microcitose com 20-80% de células *target*, enquanto que a eletroforese apresenta 85-95% de Hb E e 5-10% de Hb F (10). A identificação dos portadores de Hb E é muito importante porque a interação da Hb E com  $\alpha$  ou  $\beta$  talassemias pode dar origem a fenótipos muito variados (4).

O fenótipo clínico da Hb E/ $\beta$  talassemia varia desde uma condição indistinguível da  $\beta$  talassemia *major*, até uma condição compatível com a sobrevivência do doente, até à idade adulta, com o mínimo de tratamento (22,39). A Hb E/ $\beta$  talassemia é a combinação mais prevalente de uma variante estrutural e da  $\beta$  talassemia, no Sudeste Asiático (10).

Já foram identificadas mutações raras de deleções de  $\beta$  talassemia. Um dos grupos de deleções está restringido ao próprio gene *HBB*. Por exemplo, a deleção 619 bp remove o final 3' do gene *HBB*. Esta mutação é comum em indivíduos com ascendência asiática e indiana, sendo responsável por aproximadamente 30% das  $\beta$  talassemias nesta população. Este grupo de mutações é considerado uma mutação  $\beta^0$  talassemia. Outro grupo de mutações consiste em grandes deleções, envolvendo parte ou a totalidade do agrupamento génico da  $\beta$  globina. Estas grandes deleções são responsáveis pela  $\delta\beta$  talassemia e pela PHHF, sendo associadas com a ausência de síntese de cadeias de  $\beta$  globina e com a produção elevada de cadeias de  $\gamma$  globina (2,40). O aumento da síntese de cadeias de  $\gamma$  globina da Hb F, leva a uma diminuição do excesso de cadeias de  $\alpha$  globina livres (3). Desta forma, a  $\delta\beta$  talassemia e a PHHF são clinicamente mais ligeiras que a  $\beta^0$  talassemia (2,40). O síndrome de PHHF não é, estritamente falando, uma forma de  $\beta$  talassemia, porque não é

associado a um desequilíbrio de cadeias de globina tipo  $\alpha$ : tipo  $\beta$ , mas é caracterizado por um aumento persistente de síntese de cadeias de  $\gamma$  globina e é frequentemente considerado dentro do espectro de  $\delta\beta$  talassemia (3).

A Hb Lepore resulta de um *crossing-over* desigual entre os genes *HBB* e *HBD*, ligados e parcialmente homólogos, resultando na fusão de um gene que codifica a  $\delta\beta$  globina, que tem uma expressão diminuída (3). A Hb Lepore é constituída por duas cadeias de  $\alpha$  globina normais e duas variantes híbridas de cadeias de globina tipo  $\beta$ , compostas por resíduos de aminoácidos semelhantes ao terminal N da cadeia de  $\delta$  globina e ao terminal C da cadeia de  $\beta$  globina. Existem quatro variantes diferentes de Hb Lepore (Boston-Washington, Baltimore, Hollandia e Leiden), cada uma com diferentes locais de *crossing-over*. Os heterozigotos de Hb Lepore são fenotipicamente semelhantes aos portadores de  $\beta$  talassemia com microcitose, aproximadamente 10% de Hb Lepore, mas níveis normais ou baixos de Hb A<sub>2</sub> (41).

Foi identificada uma forma de  $\beta$  talassemia com um modo de transmissão hereditária dominante numa família irlandesa, em que vários membros tinham uma  $\beta$  talassemia moderadamente severa, que herdaram de forma mendeliana dominante (15,42). A  $\beta$  talassemia dominante é causada, de forma heterozigótica, por um único gene *HBB* mutante, associado com a produção de uma subunidade de  $\beta$  globina altamente instável, que causa danos aos GV de forma similar ao excesso de cadeias de  $\alpha$  globina (3).

A variante Hb CS, particularmente prevalente no Sudeste Asiático, é causada por uma mutação no final da cadeia de  $\alpha$  globina, resultando na síntese de uma cadeia mais alongada, que é acumulada, em níveis muito baixos, nos GV dos indivíduos afetados (3).

## 11. Diagnóstico

O diagnóstico das hemoglobinopatias depende sobretudo do laboratório clínico, que usa uma combinação de análises biofísicas, bioquímicas e moleculares para apoiar e confirmar o diagnóstico (9).

O diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias é realizado através da integração de parâmetros clínicos e hematológicos juntamente com a análise laboratorial da Hb, concluindo com a comunicação do resultado clínico aos médicos (9). A combinação destes elementos para diagnosticar as hemoglobinopatias é essencial para um tratamento adequado, bem como na prevenção e no aconselhamento genético.

Os métodos laboratoriais convencionais para o rastreio de talassemias incluem a avaliação dos índices hematológicos e a quantificação da Hb A<sub>2</sub> e da Hb F, juntamente com a detecção de Hb variantes, através de HPLC, EC ou FIE (5). A confirmação definitiva do diagnóstico é obtida pela análise do DNA (5).

Devido à complexidade das talassemias é possível que, com os protocolos laboratoriais *standard*, certas variantes heterozigóticas compostas ou duplas não sejam detetadas porque, embora sejam globalmente raras, podem ser comuns em determinadas populações étnicas (5,43).

### 11.1. Métodos Bioquímicos

A determinação dos índices hematológicos e a morfologia dos GV, seguida da separação e quantificação das frações de Hb presentes, são a base para a identificação de portadores de talassemias (4). A análise dos índices hematológicos não deve ser realizada após 24 horas da colheita porque há um aumento do tamanho dos GV, dando origem a resultados anormais (5). Um indivíduo normal e saudável, tem um volume globular médio (VGM) de 80-100 fL e uma Hb globular média (HGM) de 27-31 pg (5). Os processos analíticos utilizados nos rastreios de portadores de talassemias têm que identificar todas as variantes clinicamente relevantes mais comuns, incluindo a Hb S, a Hb C, a Hb D-Punjab, a Hb E e a Hb O-Árabe (5).

A quantificação da Hb A, Hb A<sub>2</sub> e Hb F é uma componente fundamental do diagnóstico de hemoglobinopatias porque existem vários genótipos que resultam em alterações dos rácios normais de Hb. Os rastreios de alto rendimento incluem uma dupla identificação



de quaisquer anormalidades, através de uma primeira detecção visual de um pico de uma Hb variante, seguida da quantificação de todos os tipos de Hb detetados (9). Manifestações hematológicas adicionais, observadas em indivíduos com hemoglobinopatias, são a diminuição da HGM e do VGM, anisopoiquilocitose e a presença de células *target* (9).

No rastreio de talassemias, a quantificação de ferro é um parâmetro importante na avaliação dos valores de VGM e HGM porque a deficiência em ferro é a condição responsável pela microcitose mais comum e, eventualmente, por uma anemia microcítica (4). Apesar da zinco protoporfirina estar aumentada na deficiência em ferro, a sua especificidade é baixa, pelo que o índice de saturação da transferrina, associado à ferritina sérica são os parâmetros recomendados para confirmar a deficiência em ferro (4). Quando é detetada uma deficiência em ferro, é necessário repetir os exames hematológicos após o uso de suplementos de ferro, antes do diagnóstico definitivo (4).

A presença de defeitos a nível da Hb pode levar a alterações nas propriedades biofísicas dos GV ou da própria molécula de Hb. Os três testes mais comuns que identificam estas alterações são o teste da solubilidade da célula falciforme, a detecção dos corpos de Heinz e o teste da Hb instável. De uma forma geral, estes testes são bastante sensíveis, mas não são específicos, ou seja, um resultado positivo pode apontar para uma alteração da Hb mas não define esta alteração (9). Como existe uma co-herança significativa de Hb variantes e de talassemias em determinadas regiões do mundo, é aconselhável detetar a presença de Hb anormais durante o diagnóstico de talassemias porque a sua presença não só dificulta o diagnóstico correto como altera o fenótipo e, conseqüentemente, o tratamento necessário.

Na figura 7, está exemplificado o procedimento a realizar para o rastreio das talassemias.

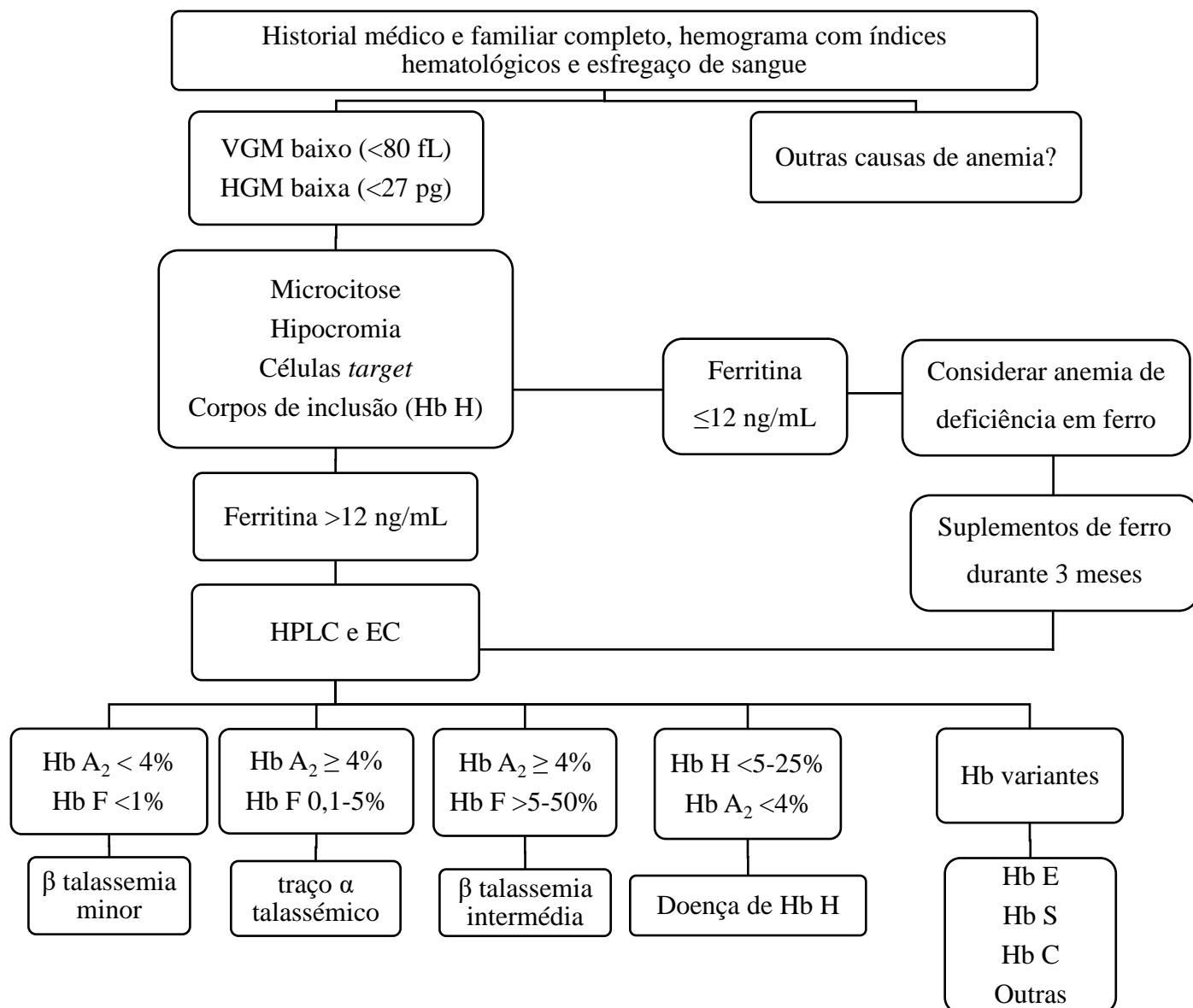


Figura 8- Fluxograma com o procedimento para diagnosticar talassemias. Adaptado de (4)

Sendo uma condição recessiva, a identificação dos portadores de talassemia é essencial e é possível através de testes hematológicos (4). O VGM inferior a 80 fL é, muitas vezes, aplicado como valor limite para casos de suspeita de talassemia, de forma a maximizar a sensibilidade (9). No entanto, os valores limite de VGM e de HGM mais utilizados são 79 fL e 27 pg, respetivamente (4).

A anemia microcítica e hipocrômica observada nas talassemias também ocorre na anemia por deficiência em ferro (ADF) (9). No entanto, nas talassemias a anemia é acompanhada por um aumento no número de GV e apresenta valores de RDW normais, enquanto que na ADF, ocorre uma diminuição do número de GV e um aumento de RDW (4,9,44). A

tabela 1 apresenta outras características laboratoriais no diagnóstico diferencial das talassemias e da ADF.

*Tabela 1- Diagnóstico diferencial de ADF e talassemias, baseado no VGM, na ferritina e na análise de Hb. Adaptado de (5).*

	Normal	ADF	$\beta$ talassemia	$\alpha$ talassemia
VGM	$\geq 80$	$< 80$	$< 80$	$< 80$
Ferritina	Normal	Diminuída	Normal	Normal
Hb A <sub>2</sub> (%)	$< 3,5$	$< 3,5$	$> 3,5$	$< 3,5$
Outras Hb	N/A	N/A	Hb A diminuída Hb F aumentada	Recém-nascidos podem apresentar Hb H ou Hb de Bart

Nos portadores de  $\beta$  talassemia o VGM e a HGM encontram-se reduzidos de forma muito significativa, enquanto que nos portadores de  $\alpha$  talassemia o VGM e a HGM estão reduzidos de forma ligeira a moderada. Em ambos os casos, os GV apresentam-se microcíticos e hipocrômicos, podendo haver uma anemia ligeira (4).

A  $\beta$  talassemia é caracterizada por um aumento da concentração relativa da Hb A<sub>2</sub> associada a uma diminuição da Hb A (5,9). Os valores de Hb A<sub>2</sub> variam entre 2,4 e 3,2% em indivíduos normais e saudáveis, sendo que em portadores de  $\beta$  talassemia podem variar entre 3,6 e 7%; os valores de Hb A<sub>2</sub> entre 3,2 e 3,6% são considerados valores limite e é necessário realizar mais análises antes de determinar o diagnóstico (4). No INSA, o valor limite de Hb A<sub>2</sub> considerado normal é 3,5%. Uma concentração de Hb A<sub>2</sub> superior a 4% tem uma sensibilidade de aproximadamente 100% e uma especificidade de 90% para o diagnóstico de uma  $\beta$  talassemia (9,45). Desta forma, a quantificação de Hb A<sub>2</sub> é o teste mais decisivo para o diagnóstico de portador de  $\beta$  talassemia. Porém, a presença de mutações de  $\delta$  talassemia pode dificultar a quantificação exata de Hb A<sub>2</sub> (4).

A  $\beta$  talassemia *major* é caracterizada por níveis de Hb e de HGM muito reduzidos,  $< 7$  g/dL e  $< 20$  pg, respetivamente. O esfregaço de sangue de indivíduos com esta condição, apresenta poiquilocitose marcada, células *target* e eritroblastos. O número de eritroblastos está relacionado com o grau de ineficácia da eritropoiese, apresentando-se marcadamente elevado após uma esplenectomia (4).

Os portadores de  $\alpha^+$  talassemia apresentam GV normais ou ligeiramente microcíticos e os valores de Hb A<sub>2</sub> e Hb F estão dentro dos valores normais. No período neonatal, podem ser detetados níveis ligeiros de Hb de Bart (1-3%). Os portadores de  $\alpha^0$  talassemia apresentam uma anemia ligeira, hipocrômica e microcítica, anisopoiquilocitose e uma ligeira redução do VGM e da HGM. No período neonatal, a Hb de Bart está presente em quantidades moderadas (3-8%) (4). Como os portadores do genótipo  $\alpha\alpha/--$  e  $\alpha-/ \alpha-$  apresentam índices hematológicos idênticos, é necessário realizar uma análise molecular para determinar qual é a mutação presente e avaliar qual é o risco de um casal poder conceber uma criança com hidropisia fetal de Bart (5).

A doença da Hb H é, obviamente, caracterizada pela presença de Hb H, cujos níveis podem variar entre 3 e 30%, e por uma anemia microcítica e hipocrômica ligeira a severa (4). Os recém-nascidos com uma deleção de três genes *HBA*, têm concentrações detetáveis de Hb de Bart aquando do nascimento, sendo que esta é posteriormente substituída por Hb H na idade adulta (9). Na hidropisia fetal de Bart, o sangue apenas contém Hb de Bart e uma pequena quantidade de Hb Portland (4).

Os dois métodos de deteção mais usados são o HPLC e a EC (9). Tanto o HPLC como a EC detetam os diferentes tipos de Hb com base nos seus diferentes potenciais de eluição ou de migração, usando a deteção espectral a 415 nm (9). As principais diferenças entre o HPLC e a EC estão descritas na tabela 2 (9).

*Tabela 2- Principais diferenças entre o HPLC e a EC no diagnóstico de hemoglobinopatias. Adaptado de (9).*

HPLC	EC
Não separa a Hb E da Hb A <sub>2</sub>	Separa todas as Hb variantes principais
Valores de Hb A <sub>2</sub> falsamente elevados em indivíduos com Hb S	Valores de Hb A <sub>2</sub> falsamente elevados em indivíduos com Hb C
É necessário recalibrar	Não é necessário recalibrar
Não são necessárias etapas adicionais em indivíduos sem Hb A	Amostras sem Hb A necessitam de diluição 1:1 para interpretar corretamente
Elevada abundância de literatura	Menor abundância relativa de literatura

### **11.1.1. HPLC**

O HPLC usa a cromatografia de troca de iões de forma a reter os principais tipos de Hb na coluna. A separação ocorre através da eluição por gradiente salino e os diferentes tempos de retenção das Hb são visualizados num cromatograma (9).

O HPLC baseia-se numa cromatografia líquida de alta eficiência de troca iónica, que em associação com um gradiente de eluição permite separar os subtipos e as variantes de Hb. As frações de Hb separadas são monitorizadas num detetor espectrofotométrico num comprimento de onda de 415 nm (24). A Hb total, ligada a uma matriz de permuta iónica sólida é eluída ao longo do tempo, através de um gradiente de pH pré-programado com uma força iónica crescente. O tempo, desde a injeção da amostra na coluna e o ponto de eluição, é conhecido como o tempo de retenção. O tempo de retenção característico para cada espécie de Hb é medido por absorvência, produzindo um cromatograma que é comparado com padrões específicos, que devem ser reproduzíveis em qualquer coluna e tampão, a uma temperatura específica (5).

O HPLC não consegue separar a Hb E da Hb A<sub>2</sub>. Isto pode dar origem a uma incapacidade de diferenciar um portador de Hb E de um portador de Hb E com uma β talassemia subjacente. De forma geral, na Hb E/β talassemia o cromatograma do HPLC apresenta um pico de Hb E mais elevado, com um aumento de Hb F e um pico de Hb A ausente ou muito reduzido. Por outro lado, o cromatograma de um portador de Hb E apresenta um pico proeminente de Hb A e a Hb E será inferior a 30% (9). A Hb Lepore também elui com a Hb A<sub>2</sub> pelo que a interpretação do cromatograma é mais difícil (5).

Como já foi mencionado, é muito importante detetar precocemente a presença de Hb estruturalmente variantes porque a sua presença altera os resultados laboratoriais. O HPLC pode apresentar valores de Hb A<sub>2</sub> indevidamente elevados devido à presença de Hb S<sub>1c</sub> em doentes com Hb S (9).

### **11.1.2. Eletroforese Capilar**

A EC baseia-se no facto de que, as moléculas carregadas eletricamente são separadas em função da sua mobilidade eletroforética, num regulador de alcalinidade com um pH específico. A separação também ocorre em função do pH do eletrólito e do fluxo

electroosmótico. As Hb, separadas em capilares de silício, são detetadas direta e especificamente através da sua absorvência a um comprimento de onda de 415 nm (24).

A EC permite a quantificação direta de Hb A, Hb F e Hb A<sub>2</sub> e pode discriminar a HbA<sub>2</sub> da Hb E e da Hb S, mas não da Hb C, pelo que os valores de Hb A<sub>2</sub> podem ser falsamente elevados em indivíduos com Hb C (5,9). A EC é capaz de identificar a Hb S, a Hb C, a Hb D-Punjab, a Hb G-Philadelphia e a Hb E, e separa a Hb Lepore e a Hb E da Hb A<sub>2</sub> (5).

Uma das vantagens da EC é que a Hb de Bart e a Hb H são detetadas e identificadas, sendo possível a sua quantificação para concentrações superiores a 3%. Outra vantagem da EC é o facto de não precisar de calibração, visto que a consistência nos capilares carregados permite que as atribuições de migração sejam baseadas na Hb A e na Hb A<sub>2</sub> presentes em cada amostra individual. No entanto, em indivíduos com Hb A ausente é necessário proceder a uma mistura com uma diluição de sangue total normal de 1:1, de forma a confirmar a identificação de variantes relativamente à migração de Hb A (9).

### **11.1.3. Focagem Isoelétrica**

Na FIE, um meio de gel com um gradiente de pH é usado para separar espécies de Hb sob ação de um campo elétrico. Cada uma das espécies de Hb presentes numa amostra migra para a zona do meio em que o pH do gel corresponde ao seu ponto isoelétrico (pI). Neste ponto, a carga elétrica torna-se zero e a migração termina. A FIE permite uma boa separação da Hb F, da Hb A e das outras variantes: Hb S, Hb C, Hb E, Hb D-Punjab e Hb O-Árabe. No entanto, a FIE não é exata para a quantificação de HbA<sub>2</sub> (5). A FIE é frequentemente considerada o *gold standard* bioquímico para mutações da Hb (9).

## **11.2. Métodos Moleculares**

A natureza complexa da componente genética das hemoglobinopatias implica um elevado nível de perícia, na interpretação dos resultados dos exames para avaliar qual é o genótipo mais provável que, posteriormente, será validado por análise do DNA (5).

A maioria dos ensaios moleculares são direcionados para mutações específicas. Em geral, estas metodologias são robustas e económicas porque identificam mutações específicas, que foram previamente descritas e estudadas extensivamente. Por outro lado, a deteção

direcionada para mutações específicas é simultaneamente uma limitação, visto que as mutações, fora dos limites pré-definidos, não são detetadas. As metodologias direcionadas incluem: Gap-PCR, amplificação de sonda dependente de ligação múltipla, *dot blots* com hibridação de oligonucleótidos específicos de alelos e PCR específica de alelos (9). Felizmente, um número limitado de mutações pontuais são prevalentes em diferentes grupos étnicos; portanto, para qualquer região étnica, é inicialmente usado um método de PCR projetado para detetar as mutações específicas comuns nessa etnia (4).

A maior parte das  $\alpha$  talassemias (95%) e um subconjunto de  $\beta$  talassemias (aproximadamente 5%) são causadas por grandes deleções cromossômicas. A metodologia convencional para detetar essas deleções é a hibridação por *Southern blot*. No entanto, a hibridação por *Southern blot* é uma técnica complicada e demorada e foi, portanto, substituída por métodos baseados em amplificação. Gap-PCR é um excelente método alternativo para detetar deleções onde os pontos de interrupção foram descritos previamente (9). Embora a análise molecular não seja exigida para confirmar o diagnóstico de portador de  $\beta$  talassemia, ela é necessária para validar a condição de portador de  $\alpha$  talassemia e obter o diagnóstico definitivo de  $\beta$  talassemia intermédia (4,11).

Com o aparecimento da sequenciação de próxima geração (SPG), o rastreio de portadores, usando painéis para uma ampla gama de doenças monogénicas, autossómicas recessivas ou ligadas ao cromossoma X, pode ser oferecido a casais de todas as etnias, aumentando significativamente as taxas de deteção (5,46). As hemoglobinopatias, incluindo a drepanocitose e as  $\alpha$  e  $\beta$  talassemias, são frequentemente incluídas nesses painéis comerciais (5). A SPG é baseada na sequenciação massiva e paralela de moléculas de DNA amplificadas que, juntamente com poder computacional suficiente e um software apropriado para uma análise eficiente de dados, permite realizar diagnósticos genéticos a um preço acessível. No entanto, a homologia entre os agrupamentos genéticos  $\alpha$  e  $\beta$  é tal, que torna a abordagem da SPG às talassemias num processo muito difícil, demorado e dispendioso (4).

### **11.3. Doseamento da Hb F**

Hoje em dia, a abordagem mais comum para a quantificação da Hb F, é a sua separação das restantes Hb por HPLC ou por EC. Na presença de algumas Hb variantes (Hb S, Hb

C, Hb Lepore e outras Hb instáveis) e em associação ao traço  $\beta$  talassêmico, há um aumento ligeiro da Hb F (1-5%) em heterozigotos e um aumento mais pronunciado em homozigotos. A presença de Hb variantes pode também interferir na quantificação da Hb F se tiverem tempos de retenção semelhantes. Durante a gravidez, a Hb F aumenta até ao seu nível máximo no início do segundo semestre de gravidez, provavelmente em resposta de uma indução fetal ou placentária da produção de células F que entram na circulação materna, e retorna aos valores normais no final da gestação. A quantificação da Hb F é muito útil no diagnóstico de Persistência Hereditária da Hb F (PHHF) e de  $\delta\beta$  talassemias (47).

#### **11.4. Dificuldades no diagnóstico**

A co-herança de cadeias de  $\delta$  globina variantes, de mutações de  $\delta$  talassemia e de deleções raras no gene *HBD*, pode dar origem a valores normais de Hb A<sub>2</sub> em portadores de  $\beta$  talassemia e interferir no diagnóstico correto desta condição. Pelo contrário, a presença de algumas Hb variantes (Hb E, Hb Spanish Town e Hb G-Accra), pode levar ao aparecimento de valores de Hb A<sub>2</sub> muito elevados. Na quantificação da Hb A<sub>2</sub> por HPLC, a Hb Lepore elui na mesma fração, pelo que heterozigotos para a Hb Lepore podem apresentar valores aparentes de Hb A<sub>2</sub> superiores a 10% (41). O diagnóstico da Hb H CS normalmente requer a análise do DNA porque a Hb é muito instável e pode não ser detetada por eletroforese (28).



## 12. Abordagens Terapêuticas

O fenótipo de portadores de talassemia varia de quase assintomático a muito severo, necessitando de TS ao longo da vida (5,32). Devido a esta carga para a saúde, muitos países com elevada prevalência de talassemia estão comprometidos com a implementação de medidas de controle, incluindo rastreio de portadores e diagnóstico pré-natal. Os casais com histórico familiar de talassemia que planeiam ter filhos são aconselhados a fazer um rastreio de hemoglobinopatias, seguido de aconselhamento genético apropriado. A interação de diferentes tipos de hemoglobinopatias pode conduzir a riscos variáveis para os descendentes, dependendo da combinação dos genótipos dos pais e do número de genes mutantes co-herdados (figura 9) (5).

	$\alpha^+$ -Talassemia	$\alpha^0$ -Talassemia	Hb S	$\beta$ -Talassemia	$\delta\beta$ -Talassemia	Hb Lepore	Hb E	Hb O-Árabe	Hb C	Hb D Punjab		
$\alpha^+$ -Talassemia	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Risco desconhecido
$\alpha^0$ -Talassemia	2	1	0	3	3	3	3	0	0	0	1	Possível risco severo
Hb S	0	0	1	1	2	2	0	1	1	1	2	Risco severo menor
$\beta$ -Talassemia	0	3	1	1	1	1	1	2	0	0	3	Risco severo maior
$\delta\beta$ -Talassemia	0	3	2	1	1	1	2	2	0	0		
Hb Lepore	0	3	2	1	1	1	2	2	0	0		
Hb E	0	3	0	1	2	2	0	0	0	0		
Hb O-Árabe	0	0	1	2	2	2	0	0	0	0		
Hb C	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
Hb D Punjab	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		

Figura 9- Severidade clínica potencial de hemoglobinopatias em crianças cujos pais têm as doenças indicadas. Adaptado de (5)

É necessária a análise do DNA antes de qualquer tratamento, para determinar o prognóstico e a terapia adequada (5). O rastreio pré-natal, o aconselhamento genético e o diagnóstico pré-natal são essenciais para identificar indivíduos em risco, de forma a assegurar um nível de cuidados apropriado, especialmente para a mãe, durante a gravidez (16,32).

### **12.1. Transplante de Medula Óssea**

O transplante de medula óssea (TMO) é, atualmente, o único método de cura para a  $\beta$  talassemia *major* (11). O TMO de irmãos com um perfil de antígenos leucocitários humanos (HLA) compatível, tem sido cada vez mais utilizado como o método de cura de hemoglobinopatias. Ao longo do tempo, um elevado número de fatores - o uso de ciclosporina, um tratamento mais eficaz da infecção pelo citomegalovírus, técnicas aperfeiçoadas de esterilidade e a evolução da terapia antibiomiocrobiana - conduziram a uma melhoria extraordinária dos resultados de TMO (10).

Foram identificadas três classes de doentes, com base nos seguintes fatores de risco, que têm uma influência significativa no resultado pós-transplante:

- Terapia de quelação inadequada
- Presença de fibrose hepática
- Hepatomegalia

Os doentes na Classe I não possuem nenhum dos fatores de risco, os doentes na Classe II possuem um ou dois fatores de risco e os doentes na Classe III possuem todos os fatores de risco. As probabilidades de sobrevivência e sobrevida livre de doença, para as crianças de classe I, com talassemia *major*, transplantadas no início da doença, são de 93% e 91%, respectivamente, com 2% de risco de rejeição e 8% de risco de mortalidade relacionada ao transplante. Os doentes de Classe II têm uma probabilidade de sobrevivência de 87% e 83% de probabilidade de sobrevida livre de doença, com 3% de risco de rejeição e 15% de risco de mortalidade por não rejeição, enquanto os doentes de Classe III têm uma 79% de probabilidade de sobrevivência e 58% de probabilidade de sobrevida livre de doença, com 28% de risco de rejeição e 19% de risco de mortalidade por não rejeição (10).

De forma geral, a utilização do TMO é limitada pela disponibilidade de um familiar dador, com um HLA compatível. Existe 25% de probabilidades que um irmão tenha um HLA compatível, no entanto, a probabilidade de um paciente com talassemia ter um irmão dador com um HLA compatível varia com o tamanho da família. Como a maioria dos doentes com talassemia não possui um irmão dador compatível, há interesse em usar dadores não familiares compatíveis. Infelizmente, as taxas de complicações de transplantes usando dadores não familiares compatíveis são geralmente muito maiores do que com os transplantes entre irmãos compatíveis (10). Espera-se que com as melhorias

contínuas nas técnicas de correspondência (*matching*), as taxas de complicações serão reduzidas a níveis aceitáveis (10).

O uso de células estaminais, obtidas a partir de sangue do cordão umbilical colhido no momento do parto, tem tido um interesse crescente. Existem várias vantagens possíveis para essa abordagem. Primeiro, as células estaminais podem ser obtidas facilmente na altura do nascimento e, muitas vezes, em quantidade suficiente para uma doação bem-sucedida - evitando assim a colheita da medula óssea de um dador numa idade posterior. Em segundo lugar, foi sugerido que a doença do enxerto versus hospedeiro (DEVH) pode ser menos grave, quando as células estaminais são obtidas neste momento inicial da vida. Em terceiro lugar, a rotina de colheita de células estaminais do sangue do cordão umbilical de todos os partos, proporcionaria um conjunto maior de doadores para a cura da  $\beta$  talassemia *major* (10). No entanto, a evidência de diminuição da DEVH usando o sangue do cordão umbilical não é persuasiva. E, em muitos casos, a quantidade de células estaminais obtidas é insuficiente para um transplante num indivíduo adulto (10).

Embora o TMO tenha um custo elevado, ele pode ser considerado económico quando comparado com o valor das TS ao longo da vida, juntamente com a quelação e a gestão das complicações da talassemia. O TMO é uma opção económica mesmo nos países em desenvolvimento. Atualmente, mais de 30% dos TMO são realizados regularmente em países não industrializados, sem diferenças significativas com os TMO realizados nos países industrializados, em termos de resultados (11,48).

O seguimento clínico pós-transplante, em indivíduos com  $\beta$  talassemia *major*, é particularmente importante. No primeiro ano, é essencial a monitorização cuidadosa dos parâmetros hematológicos e de enxerto, complicações infecciosas e DEVH. O acompanhamento a longo prazo, após TMO, é de particular interesse na monitorização da evolução de problemas de múltiplos sistemas relacionados com a talassemia, nomeadamente a sobrecarga de ferro, o desenvolvimento puberal, o atraso do crescimento e as deficiências endócrinas. A sobrecarga de ferro, a hepatite crónica, a função cardíaca e as deficiências endócrinas podem ser mais facilmente controladas após o TMO, permitindo ocasionalmente a cicatrização de órgãos danificados (10). É particularmente importante remover o excesso de ferro após o TMO. Isso geralmente pode ser conseguido por flebotomia (6 mL/kg de sangue retirado a intervalos de 14 dias) (10).

## 12.2. Transfusões de sangue

As TS continuam a ser a terapia *standard* para as formas severas de talassemia, sendo que a sua frequência e requisitos variam, de forma indireta, com a severidade da doença (4).

Os objetivos principais das TS são:

- Manter a viabilidade e a funcionalidade dos GV durante o armazenamento, de forma a assegurar o aporte suficiente de oxigénio;
- Usar os GV do dador, com um tempo de vida e de recuperação normal no recetor;
- Atingir os níveis apropriados de Hb;
- Evitar reações adversas, incluindo a transmissão de agentes infecciosos (10).

Para salvaguardar a saúde dos recetores de TS, incluindo os doentes com talassemia, a dádiva de sangue deve ser colhida de dadores voluntários, cuidadosamente selecionados e não remunerados e, deve ser colhida, processada, armazenada e distribuída pelos centros nacionais de TS. Os doentes com  $\beta$  talassemia devem de receber unidades de GV leucorreduzidos e com um conteúdo mínimo de Hb de 40 g. A leucorredução contribui para a diminuição do número de reações adversas após as TS e na prevenção da aloimunização (10).

Nem todos os doentes com talassemias necessitam de TS, pelo que é necessário realizar uma avaliação, para determinar quais os indivíduos com indicação para iniciar o tratamento. Os critérios de avaliação incluem o diagnóstico laboratorial confirmado de  $\beta$  talassemia, uma Hb  $< 7$  g/dL em duas ocasiões diferentes, com uma separação de 2 semanas e exclusão de outras causas para a anemia (por exemplo, infeções), ou uma Hb  $> 7$  g/dL e alterações faciais, atrasos no desenvolvimento, fraturas e hematopoiese extramedular (10).

O tratamento recomendado inclui TS a cada 2-5 semanas, de forma a manter uma Hb pré-transfusão de 9-10,5 g/dL. É necessário manter um registo cuidado para cada paciente, incluindo o volume ou o peso das unidades de sangue administradas, o hematócrito das mesmas unidades e o peso do paciente. Estes dados permitem calcular o volume total de sangue e de GV transferidos por kg de peso corporal e a quantidade de ferro transferido por kg de peso corporal no período de um ano. Caso não seja possível calcular estas estimativas, assume-se que cada unidade de sangue contém 200 mg de ferro. Idealmente, um indivíduo com talassemia, deverá receber as TS sempre no mesmo local e, quaisquer

planos de viagem, devem ser coordenados com o plano de transfusões do doente, de forma a evitar receber TS noutros locais (10).

### **12.3. Quelação de sangue**

A ausência de qualquer mecanismo do organismo humano para excretar o excesso de ferro, torna essencial a terapia de quelação de ferro que constitui, juntamente com as TS, a base do tratamento de doentes com talassemias (10). A quelação aumentou de forma significativa o tempo de vida dos doentes com talassemia, por diminuir o número de mortes prematuras por insuficiência cardíaca, devido ao excesso de ferro (49). A absorção normal de ferro no intestino é 1-2 mg/dia, sendo aumentada múltiplas vezes em indivíduos com talassemias que não recebem TS (10).

O objetivo primário da quelação de ferro é diminuir a quantidade de ferro nos tecidos de forma a manter níveis constantes e seguros de ferro no organismo (10). A sobrecarga de ferro é a causa principal de morbilidade e mortalidade na  $\beta$  talassemia. A acumulação crónica de ferro é causada pelas TS (6-10 g/ano) e, em parte, devido à absorção aumentada no intestino (11).

É recomendado medir a ferritina a cada 3 meses e fazer uma ressonância magnética (RM) ao fígado e ao coração todos os anos, ou mais frequentemente, se necessário (23). A concentração de ferro no fígado (CFF) é considerada o padrão de referência para calcular a carga de ferro no organismo, e prever a quantidade de ferro total nas reservas do corpo. A CFF pode ser medida por biópsia, por RM ou por biosusceptometria (1).

A RM também é capaz de medir, de forma não invasiva, o ferro no tecido cardíaco através das diferenças de relaxamento magnético entre os tecidos normais e os tecidos sobrecarregados de ferro (11). O T2\* é o tempo necessário para que o sinal do miocárdio diminua em 63%, e seja medido em milissegundos; no miocárdio saudável o T2\* é de 40 ms e, devido à sua distribuição não paramétrica, os indivíduos saudáveis não possuem valores abaixo de 20 ms (11,50). O valor de T2\* diminui com o aumento da concentração de ferro (10). Logo, para além de identificar os doentes em risco de insuficiência cardíaca, o T2\* no miocárdio também identifica aqueles em quem o tratamento de quelação deve ser intensificado. Portanto, a RM tem um grande impacto nas escolhas de quelação (11). Evidências recentes sugerem que a primeira avaliação de T2\* deve ser realizada tão cedo

quanto aos 6 anos, se o paciente realizar TS massivas ou se tiver uma quelação insuficiente (11,51).

O dano às células  $\beta$  pancreáticas parece estar correlacionado com o stress oxidante secundário à acumulação de ferro e com a resistência crónica à insulina. Recentemente, a RM foi usada para medir a sobrecarga de ferro no pâncreas. As técnicas de RM também foram usadas para avaliar a sobrecarga de ferro da hipófise e o seu volume. Estes dois parâmetros são fatores preditivos e independentes do hipogonadismo. O hipogonadismo é a morbilidade mais comum nos indivíduos com  $\beta$  talassemia *major* (11).

### 12.3.1. Complicações

A sobrecarga de ferro e as suas consequências são as principais complicações resultantes da terapia de TS. Um adulto com talassemia *major* que receba duas unidades de GV a cada 3 semanas, vai acumular 10g de ferro por ano (16).

A hepatopatia é a maior complicação da  $\beta$  talassemia e, é provocada pelo dano causado pelo excesso de ferro no fígado e, no caso particular de doentes mais antigos, por causa dos efeitos das infeções virais, transmitidas pelas TS (11). As complicações causadas pelo excesso de ferro incluem a cirrose hepática, insuficiência cardíaca e arritmias, e complicações endócrinas, como diabetes *mellitus*, hipogonadismo, hipotireoidismo e osteoporose (16).

A sobrecarga de ferro aparece mais cedo no fígado e, posteriormente, no coração e no pâncreas, devido a diferentes mecanismos de carga e descarga de ferro (11,52). Além disso, quando o ferro hepático aumenta, a reserva de ferro lábil aumenta rapidamente e, pode entrar no coração. Portanto, a quelação adequada do ferro do fígado, parece ser essencial para prevenir não apenas a fibrose e a cirrose hepática, mas também o envolvimento cardíaco (11).

Em doentes com  $\beta$  talassemia *major*, a principal causa de morte continua a ser a insuficiência cardíaca, por sobrecarga de ferro no coração. O início da cardiomiopatia é insidioso e, muitas vezes, é encoberto pelo facto de que a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, por causa da anemia crónica, tende a permanecer por muito tempo no intervalo de valores normais para pessoas não anémicas. A morbilidade e a mortalidade por

cardiomiopatia relacionada ao ferro são evitáveis, se for instituída e mantida, ao longo do tempo, uma terapia de quelação adequada (11).

A deterioração dos órgãos endócrinos, incluindo o pâncreas, é uma complicação comum na  $\beta$  talassemia *major*. Como esses órgãos acumulam exclusivamente o ferro não ligado à transferrina, eles podem estar danificados, mesmo quando o equilíbrio total do ferro do corpo é neutro ou negativo (11,53).

Quase 60% dos doentes adultos com  $\beta$  talassemia *major* apresentam uma massa óssea reduzida para a idade, com um maior risco de fraturas e dor óssea (11,54). O excesso de ferro é um fator importante para a redução da densidade mineral óssea. A sobrecarga de ferro é responsável pelo hipogonadismo que, por sua vez, causa osteopenia e osteoporose. A esplenomegalia é uma complicação normal em indivíduos que realizam TS, de forma regular. Antigamente, era normal realizar-se uma esplenectomia na primeira década de vida mas, hoje em dia, adia-se a realização de uma esplenectomia o máximo possível, devido às complicações trombóticas e às infecções (11).

### 12.3.2. Agentes Quelantes

A desferroxamina (DFO) foi o único agente quelante disponível, durante quase 30 anos, e requer administração subcutânea, o que diminui a conformidade e tem eficácia limitada a nível cardíaco. Com a introdução de dois quelantes orais no mercado – a deferiprona (DFP) e o deferasirox (DFX), a quelação tornou-se um processo mais simples e fácil para indivíduos com talassemias, e aumentou a sua conformidade (11,49).

As principais desvantagens da DFO são o seu custo elevado e a sua administração parental. O ferro em excesso é excretado na urina e nas fezes, sendo que, com o aumento da concentração da DFO também há um aumento na proporção de ferro excretado nas fezes. O ferro excretado na urina resulta da destruição dos GV pelos macrófagos, enquanto que o ferro excretado nas fezes resulta da quelação do mesmo no fígado (10).

São necessárias três moléculas de DFP para se ligarem a um átomo de ferro e a eficiência desta ligação diminui à medida que a concentração de ferro ou do agente quelante diminui. A excreção de ferro é quase exclusivamente urinária(10).

O DFX é o agente quelante mais recente e necessita de duas moléculas de DFX para se ligar a um átomo de ferro. A excreção de ferro é quase exclusivamente fecal(10).

Um estudo prospetivo randomizado, recente, analisou 96 doentes, com dois tipos de tratamento de quelação diferentes: DFP/DFO e DFP/DFX. Ambos apresentaram uma redução da ferritina sérica e uma melhoria do T2\* cardíaco. No entanto, a combinação DFP/DFX foi melhor na diminuição da sobrecarga de ferro do miocárdio, na conformidade e na satisfação do paciente, sem eventos adversos significativos (11,55). A combinação de agentes quelantes vai-se tornar a base da terapia de quelação e contribuir para a melhoria da prevenção e do tratamento da sobrecarga de ferro (11).

#### **12.4. Prevenção e Rastreio**

A prevenção inclui a identificação atempada de casais portadores para que eles possam ser informados sobre suas escolhas reprodutivas e, em seguida, proceder à seleção da opção reprodutiva mais apropriada para eles. As hemoglobinopatias são, com raras exceções, transmitidas de forma autossómica recessiva, o que significa que, quando ambos os parceiros de um casal possuem mutações graves do gene *HBB* ou do gene *HBA*, há 1 em 4 possibilidades de que cada gravidez será afetada com uma hemoglobinopatia severa (12).

A maioria dos casais não opta pela doação de gâmetas nem pela adoção, pelo que as opções reprodutivas preferidas são o diagnóstico pré-natal ou o diagnóstico genético pré-implantação (DGPI) (12). Devido a questões culturais ou religiosas, alguns países não permitem o aborto terapêutico e como as taxas de cancelamento de casamentos entre portadores são diminutas, é difícil alcançar um controlo eficaz dos nascimentos de crianças com talassemias (56).

##### **12.4.1. Rastreio Pré-matrimonial**

O objetivo do rastreio pré-matrimonial é identificar o estado de portador em casais para avaliar a possibilidade de ter um filho com talassemia. Estes casais têm várias opções incluindo não se casarem, fertilização *in vitro*, adoção ou realizarem um rastreio pré-natal com a possibilidade de abortar. Os países onde o rastreio pré-matrimonial é obrigatório são os Emirados Árabes Unidos, a Arábia Saudita, a Jordânia, o Chipre, o Irão e a Turquia (5).



#### **12.4.2. Rastreio Pré-natal**

A maior desvantagem do rastreio pré-natal é o término da gravidez se o casal decidir ter filhos que não sejam afetados por hemoglobinopatias (12). Atualmente, existem dois procedimentos para a obtenção de material genético fetal: amostragem de trofoblastos a partir das 11 semanas de gravidez e amniocentese, geralmente após 15 semanas (12,57). O uso de sangue materno como fonte de DNA fetal, para determinar o genótipo fetal ainda está sendo validado para aplicação clínica, embora seja provável que o diagnóstico pré-natal não-invasivo para doenças monogénicas seja, em breve, uma opção adicional para analisar o estado genético de uma gravidez em curso (12,58). O custo do rastreio pré-natal é muito inferior ao custo de tratamentos para a talassemia durante toda a vida, pelo que o rastreio pré-natal é a opção com melhor custo-efetividade (56).

#### **12.4.3. Diagnóstico Genético Pré-implantação**

O objetivo do DGPI é caracterizar o estado genético das células, que foram colhidas de oócitos/zigotos ou embriões cultivados *in vitro*, durante o tratamento reprodutivo assistido. O DGPI pode ser aplicado como uma forma de diagnóstico pré-natal precoce com o objetivo de estabelecer uma gravidez não afetada por uma hemoglobinopatia. Além disso, o DGPI pode identificar embriões que são HLA compatíveis com um irmão existente, afetado por uma hemoglobinopatia, para permitir um transplante de células estaminais hematopoiéticas. A DGPI tem uma vantagem em relação ao diagnóstico pré-natal convencional, porque não há a necessidade de considerar o término da gravidez caso o embrião seja afetado. No entanto, o PDGI é um procedimento amplo, complexo e dispendioso, com um resultado imprevisível e, portanto, é mais adequado para casais com um histórico de dificuldades em engravidar (12).

### **12.5. Novas Abordagens**

#### **12.5.1. Modulação da síntese de cadeias de $\gamma$ globina para a $\beta$ talassemia *major***

Uma abordagem inovadora, consiste na reativação dos genes responsáveis pela síntese de Hb F, de forma a corrigir ou melhorar o desequilíbrio das cadeias de globina na  $\beta$  talassemia *major* (10). Esta abordagem baseia-se no facto que, os doentes com  $\beta$

talassemia que produzem níveis mais elevados de Hb F, como no caso da PHHF, têm um desequilíbrio das cadeias de globina menos acentuado e apresentam uma anemia menos severa (10).

Uma maior produção de cadeias de  $\gamma$  globina, poderia corrigir o desequilíbrio entre as cadeias de globina tipo  $\alpha$ : tipo  $\beta$ , neutralizando o excesso de cadeias de  $\alpha$  globina e aumentar a sobrevivência dos precursores eritroides, o que melhoraria a anemia dos pacientes com  $\beta$  talassemia. Atualmente, estão a investigar-se três classes terapêuticas diferentes de indutores da cadeia de  $\gamma$  globina, incluindo agentes citostáticos de hipometilação, derivados de ácidos gordos de cadeia curta e a eritropoietina recombinante (11).

### **12.5.2. Terapia Genética**

O conceito de usar a terapia genética para curar as hemoglobinopatias é simples. Os GV são produzidos de forma contínua pelas células estaminais hematopoiéticas da medula óssea. Assim sendo, a transferência de uma cópia estável do gene que sintetiza para a globina afetada, nas células estaminais hematopoiéticas da medula óssea, daria origem a uma nova geração GV funcionais. Neste caso, não se utilizou um transplante de medula óssea. A introdução da cópia estável do gene terapêutico, nas células estaminais hematopoiéticas da medula óssea é realizada através de um vetor retroviral, resultando no *splicing* permanente, ou na integração do gene terapêutico no DNA das células estaminais hematopoiéticas. O gene terapêutico é, então, mantido para o resto da vida (10).

Recentemente, iniciaram-se ensaios clínicos usando a terapia genética para as hemoglobinopatias, com o objetivo de curar 5 pessoas com  $\beta$  talassemia e 5 pessoas com drepanocitose, com idades compreendidas entre os 5 e os 35 anos (10).

## **12.6. Aconselhamento genético e Cuidados**

Até ao momento, o diagnóstico pré-natal é o único método de prevenir o nascimento de uma criança com talassemia. Desta forma, em regiões onde a talassemia é altamente prevalente, uma estratégia ideal e efetiva de diminuir a taxa de doentes com talassemia é identificar casais de alto risco de transmissão. Quando ambos os pais são portadores, é necessário realizar um diagnóstico pré-natal durante a gravidez (2).

Os pais, sem uma compreensão completa da transmissão genética das talassemias, podem não considerar o risco inerente a futuras gravidezes. O aconselhamento genético deve incluir discussões sobre opções de prevenção pré-concepção, incluindo a escolha do parceiro, não ter um filho biológico, usando sêmen/óvulo doado, o diagnóstico pré-implantação ou o diagnóstico pré-natal (16,59).

Quando um diagnóstico de doença de Hb H,  $\beta$  talassemia intermédia (incluindo Hb E/ $\beta$  talassemia) ou  $\beta$  talassemia *major* for confirmado, os pacientes e os pais devem receber aconselhamento completo e realista sobre a doença e seu curso, acompanhados por uma equipa especialista experiente. No tratamento de pacientes com talassemia, os pais e irmãos de indivíduos diagnosticados, também devem ser avaliados para a possibilidade de serem portadores ou possuírem outras mutações, e ser-lhes fornecido aconselhamento genético adequado. Finalmente, os pais devem ser aconselhados sobre o rastreio pré-natal e os riscos de ter outra criança afetada durante cada gravidez subsequente (16,37).

O aconselhamento genético está condicionado por alguns fatores, nomeadamente, a barreira linguística, quando se presta cuidados a imigrantes, e fatores socioculturais, que podem atrasar a primeira consulta após a gravidez, impedindo o respetivo rastreio pré-natal e o aborto terapêutico associado (56).

## 13. Conclusões

A talassemia é uma doença com um grande impacto na saúde pública, porque os indivíduos portadores (heterozigotos) podem passar a sua vida inteira sem serem devidamente diagnosticados, sendo assintomáticos ou apresentarem uma ligeira anemia. No entanto, os indivíduos homozigotos, resultantes de uma gravidez com dois pais portadores, apresentam elevadas morbidades, que condicionam a vida do doente, e uma grande incidência de mortalidade, especialmente se o tratamento não for adequado.

A talassemia é, agora mais do que nunca, uma doença de desequilíbrio. A nível celular, há um desequilíbrio na síntese de cadeias de globina, e a nível da sociedade, há um desequilíbrio entre a disponibilidade de recursos e a necessidade dos mesmos (49). É necessário, agora mais que nunca, aumentar a colaboração entre os países desenvolvidos e os países em desenvolvimento, para que com a troca de recursos e de informações, se possa travar a progressão das talassemias. Devido ao aumento da vida útil dos doentes com talassemias e a migração dos mesmos, as talassemias estão, rapidamente, a alastrar-se por países onde a sua presença era rara. Embora os países mais industrializados tenham mais recursos financeiros e tecnológicos para detetarem e prevenirem as talassemias, não possuem a experiência adquirida pelos países em desenvolvimento, pelo que não são tão capazes de promover rastreios intensivos, nem estão prontos para detetarem novas mutações, que não façam parte das mutações previamente encontradas e documentadas naquele país. As questões socioculturais e a barreira linguística continuam a ser um obstáculo à prevenção das talassemias, sobretudo em populações imigrantes. Uma parte significativa dos países onde as talassemias são endémicas, já implementou programas de rastreios obrigatórios, e a maioria dos restantes países, possuem bons programas de rastreio e tiveram sucesso na redução das taxas de nascimento de crianças afetadas por talassemias. Por motivos religiosos e culturais, o aborto terapêutico não é permitido em alguns países, pelo que a prevenção de nascimentos de crianças afetadas por talassemias nesses países não é tão bem-sucedida.

Atualmente, em Portugal, é recomendada a deteção e informação precoce, preferencialmente pré-concepcional, de adultos portadores, a identificação e o aconselhamento genético dos casais em risco, e, quando necessário, a oferta de diagnóstico pré-natal (60). No entanto, o grau de informação e esclarecimento relativamente às talassemias varia nas diversas regiões do país e entre profissionais de

saúde. Os únicos estudos epidemiológicos realizados em Portugal no âmbito das hemoglobinopatias decorreram entre 1983 e 1985, sendo que entre 1987 e 1993 realizou-se um rastreio orientado de portadores no âmbito do PNCH. O PNCH foi instituído em 1986 e encontra-se, atualmente, desativado, sendo que o último estudo epidemiológico de talassemias em Portugal foi realizado em 1993. Atualmente, desconhece-se o número exato de pessoas com talassemias em Portugal, nem está prevista a implementação de um programa que vise prevenir e controlar os nascimentos de crianças afetadas por talassemias, apesar de Portugal ser um país com uma elevada incidência de hemoglobinopatias. Esta mesma incidência, juntamente com os fenómenos de imigração de pessoas oriundas de países onde as talassemias são endémicas, faz prever um aumento considerável de casos de talassemias em Portugal. No entanto, sem um novo estudo epidemiológico, não é possível tirar conclusões exatas.

## 14. Perspetivas Futuras

A esperança média de vida de indivíduos com talassemia aumentou significativamente nas últimas décadas, de tal forma que, com os avanços científicos atuais, é difícil de prever qual a esperança média de vida para o futuro (49,61). No entanto, a prevalência das talassemias engloba, na sua maioria, países em desenvolvimento, que não possuem os recursos financeiros e tecnológicos necessários para disponibilizar à população os métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento apropriados (49). Na realidade, a taxa de sobrevivência de doentes com talassemia em países de baixo rendimento, é similar à taxa da Europa e dos Estados Unidos de há 50 anos atrás (49,62). As infeções são uma das causas de morte mais comuns para indivíduos com talassemias, sobretudo em crianças, mas graças à terapia antibiótica, há cada vez mais pessoas a sobreviverem e a chegarem a idade adulta, resultando num aumento de indivíduos com talassemias, que necessitam de terapia a longo prazo. Todos estes fatores contribuem para que a talassemia seja um problema de saúde global grave, que irá perdurar nas próximas décadas (49,63).

No início do presente ano, foi publicado na revista Nature, um artigo que demonstrava que a edição do genoma tem potencial para a correção direcionada das mutações da linha germinal. O artigo descreveu a correção da mutação MYBPC3 heterozigótica em embriões humanos para pré-implantação através da CRISPR-Cas9. A eficiência, precisão e segurança da abordagem apresentada sugere que tem potencial para ser usada para a correção de mutações hereditárias em embriões humanos, complementando o diagnóstico genético pré-implantação. No entanto, ainda há muito a ser considerado antes das aplicações clínicas, incluindo a reprodutibilidade da técnica com outras mutações heterozigóticas (64).

No futuro, novas descobertas de intervenção médica vão alterar o resultado clínico de condições universalmente fatais como a hidropisia fetal de Bart, através de TS intrauterinas, seguidas de um transplante de células estaminais hematopoiéticas após o nascimento (56,65).

É de extrema importância promover a investigação científica na área das hemoglobinopatias, de modo a realizarem-se mais ensaios clínicos, com novas abordagens terapêuticas. O objetivo das novas abordagens terapêuticas é encontrar uma cura para as talassemias, alternativa ao transplante de medula óssea, e minorar as consequências desta patologia. Simultaneamente, é necessário continuar a investir nos

## Talassemias: Etiologia, Fisiopatologia, Diagnóstico e Abordagens Terapêuticas

programas de rastreio, em especial nos rastreios pré-matrimoniais e pré-natais, de forma a haver uma diminuição significativa do nascimento de crianças com talassémias graves. Com o devido investimento local, e com o apoio global dos especialistas em talassemias, será possível evitar a maioria dos nascimentos de crianças afetadas.

Relativamente a Portugal, considero de extrema importância reativar o PNCH e realizar um novo estudo epidemiológico de talassemias, para averiguar a sua frequência atual e implementar um programa adequado de prevenção e acompanhamento para os doentes com hemoglobinopatias.

## 15. Referências bibliográficas

1. Bain B. Haemoglobinopathy Diagnosis. 2nd ed. Blackwell Publishing; 2001. 1-326 p.
2. Shang X, Xu X. Update in the genetics of thalassemia: What clinicians need to know. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2017;39(November):3–15.
3. Forget B, Bunn H. Classification of the disorders of hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(2):1–15.
4. Brancaleoni V, Di Pierro E, Motta I, Cappellini MD. Laboratory diagnosis of thalassemia. *Int J Lab Hematol.* 2016;38:32–40.
5. Barrett AN, Saminathan R, Choolani M. Thalassaemia screening and confirmation of carriers in parents. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2017;39(November):27–40.
6. Weatherall D. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. 2012;115(22):4331–6.
7. Martins M, Olim G, Melo J, Magalhães H, Rodrigues M. Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance, and control. *J Med Genet.* 1993;30(3):235–9.
8. Inez F, Sequeira M, Santos P, Al E. Contribuição do rastreio de portadores para a prevenção da beta talassemia e da drepanocitose na população portuguesa: um estudo multicêntrico. *Arq Insa.* 1993;19:27–31.
9. Greene DN, Vaugn CP, Crews BO, Agarwal AM. Advances in detection of hemoglobinopathies. *Clin Chim Acta.* 2014;439:50–7.
10. Cappellini M, Cohen A, Eleftheriou A, Piga A, Porter J, Taher A. Guidelines for the Clinical Management of Thalassaemia. 2nd ed. Thalassaemia International Federation; 2008.
11. Origa R, Baldan A, Marsella M, Borgna-Pignatti C. A complicated disease: what can be done to manage thalassemia major more effectively? *Expert Rev Hematol.* 2015;8(6):1–12.
12. Traeger-Synodinos J. Pre-implantation genetic diagnosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2017;39:74–88.



13. Turgeon ML. Clinical Hematology - Theory and Procedures. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2005. 1-612 p.
14. Hoffbrand A, Moss P, Pettit J. Fundamentos em Hematologia. 6th ed. Santana: Artmed; 2008. 1-462 p.
15. Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat Rev Genet.* 2001;2:245–55.
16. Sayani F, Kwiatkowski J. Increasing prevalence of thalassemia in America: Implications for primary care. *Ann Med.* 2015;47(7):592–604.
17. Voon H, Vadolas J. Controlling  $\alpha$ -globin: A review of  $\alpha$ -globin expression and its impact on  $\beta$ -thalassemia. *Haematologica.* 2008;93(12):1868–76.
18. Stamatoyannopoulos G. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Exp Hematol.* 2010;33(3):1–20.
19. Fucharoen S, Weatherall DJ. Progress Toward the Control and Management of the Thalassemias. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2016;30:359–71.
20. Kassebaum N, Jasrasaria R, Naghavi M, Wulf S, Johns N, Lozano R, et al. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood J.* 2014;123(5):615–25.
21. Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ.* 2008;86(6):480–7.
22. Weatherall DJ. Thalassemia as a global health problem: Recent progress toward its control in the developing countries. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1202:17–23.
23. Weatherall D, Clegg J. Inherited haemoglobin disorders: An increasing global health problem. *Bull World Health Organ.* 2001;79(8):704–12.
24. Polainas S. Diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias: Avaliação dos resultados analíticos obtidos por diferentes metodologias. 2017.
25. Hartevelde C, Higgs D. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5(1):13.
26. Galanello R, Cao A. Alpha-thalassemia. *Genet Med.* 2011;13(2):83–8.
27. Longo DL, Piel FB, Weatherall DJ. The  $\alpha$ -Thalassemias. *N Engl J Med.* 2014;371:1908–16.

28. Vichinsky E. Non-transfusion-dependent thalassemia and thalassemia intermedia: epidemiology, complications, and management. *Curr Med Res Opin.* 2016;32(1):191–204.
29. Kan YW, Nathan DG. Mild thalassemia: the result of interactions of alpha and beta thalassemia genes. *J Clin Invest.* 1970;49(4):635–42.
30. R. Galanello, E. Dessi, M.A. Melis, M.A. Sanna, C. Rosatelli, F. Argiolu, N. Giagu, M.P. Turco, E. Cacace, M. Pirastau AC. Molecular Analysis of beta zero thalassemia intermedia in Sardinia. 1989;74(2):823–7.
31. Weatherall DJ, Wood WG, Pressley L, Higgs DR, Clegg JB. Molecular Basis for Mild Forms of Homozygous Beta-Thalassaemia. *Lancet.* 1981;317:527–9.
32. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5(11):1–15.
33. Cappellini M, Poggiali E, Taher A, Musallam K. Hypercoagulability in  $\beta$ -thalassemia: a status quo. *Expert Rev Hematol.* 2012;5(5):505–12.
34. Rivella S. The role of ineffective erythropoiesis in non-transfusion dependent thalassemia. *Blood Rev.* 2012;26(1):1–8.
35. Rachmilewitz E, Giardina P. How I treat thalassemia. *Blood.* 2011;118(13):3479–88.
36. Taher AT, Musallam KM, Cappellini MD, Weatherall DJ. Optimal management of  $\beta$  thalassaemia intermedia. *Br J Haematol.* 2011;152:512–23.
37. Vichinsky EP, Bhatia S, Bojanowski J, Coates T, Foote D, Fung EB, et al. Standards of Care Guidelines for Thalassemia. 2012;1–27.
38. Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G. Thalassaemia. *Lancet.* 2012;379:373–83.
39. Olivieri NF, Muraca GM, O'Donnell A, Premawardhena A, Fisher C, Weatherall DJ. Studies in haemoglobin E beta-thalassaemia. *Br J Haematol.* 2008;141:388–97.
40. Thein SL. The molecular basis of  $\beta$ -thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(5):1–24.
41. Luo H, Chui D. Diverse hematological phenotypes of  $\beta$ -thalassemia carriers. *Ann N Y Acad Sci.* 2016;1368(1):49–55.

42. Weatherall D. A genetically determined disorder with features both of thalassaemia and congenital dyserythropoietic anaemia. *Br J Haematol.* 1973;24:681–702.
43. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med.* 2010;12(2):61–76.
44. Old J, Harteveld CL, Traeger-Synodinos J, Petrou M, Angastiniotis M, Galanello R. *Prevention of Thalassaemias and Other Haemoglobin Disorders.* 2nd ed. Thalassaemia International Federation; 2012.
45. Mosca a, Paleari R, Ivaldi G, Galanello R, Giordano PC. The role of haemoglobin A(2) testing in the diagnosis of thalassaemias and related haemoglobinopathies. *J Clin Pathol.* 2009;62(1):13–7.
46. Haque I, Lazarin G, Kang H, Evans E, Goldberg J, Wapner R. Modeled Fetal Risk of Genetic Diseases Identified by Expanded Carrier Screening. *Jama.* 2016;316(7):734–42.
47. Mosca A, Paleari R, Leone D, Ivaldi G. The relevance of hemoglobin F measurement in the diagnosis of thalasseмии and related hemoglobinopathies. *Clin Biochem.* 2009;42(18):1797–801.
48. Donatella B, Federica P, Sarah L, Ulrike P, Giorgio D, Christina P. Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Thalassaemia Major. Report from the EBMT Hemoglobinopathy Registry. *Blood.* 2011;118(21):1–905.
49. Rund D. Thalassaemia 2016: Modern medicine battles an ancient disease. *Am J Hematol.* 2016;91(1):15–21.
50. Anderson L, Holden S, Davis B, Prescott E, Charrier C, Bunce N, et al. Cardiovascular T2-star (T2\*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *Eur Heart J.* 2001;22(23):2171–9.
51. Borgna-Pignatti C, Meloni A, Guerrini G, Gulino L, Filosa A, Ruffo GB, et al. Myocardial iron overload in thalassaemia major. How early to check? *Br J Haematol.* 2014;164(4):579–85.
52. Pennell D, Porter J, Piga A, Lai Y, El-Beshlawy A, Belhoul K, et al. A 1-year randomized controlled trial of deferasirox versus deferoxamine for myocardial iron removal in beta-thalassaemia major (CORDELIA). *Blood.* 2014;123(10):1447–54.

53. Noetzli LJ, Carson SM, Nord AS, Coates TD, Wood JC. Longitudinal analysis of heart and liver iron in thalassemia major. 2008;112(7):2973–8.
54. Vogiatzi M, Macklin E, Fung E, Cheung A, Vichinsky E, Olivieri N, et al. Bone Disease in Thalassemia: A Frequent and Still Unresolved Problem. *J Bone Miner Res.* 2009;24(3):543–57.
55. Elalfy M, Adly A, Wali Y, Tony S, Samir A, Elhenawy Y. Efficacy and safety of a novel combination of two oral chelators deferasirox/deferiprone over deferoxamine/deferiprone in severely iron overloaded young beta thalassemia major patients. *Eur J Haematol.* 2015;95(5):411–20.
56. Li CK. New trend in the epidemiology of thalassaemia. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2017;39:16–26.
57. Jauniaux E, Pahal GS, Rodeck CH. What invasive procedure to use in early pregnancy? *Bailliere’s Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2000;14(4):651–62.
58. Chitty LS, Lo YMD. Noninvasive prenatal screening for genetic diseases using massively parallel sequencing of maternal plasma DNA. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(9):1–21.
59. Giordano PC. Prospective and retrospective primary prevention of Hemoglobinopathies in multiethnic societies. *Clin Biochem.* 2009;42(18):1757–66.
60. Direccção-Geral da Saúde. Prevenção das formas graves de Hemoglobinopatia. Circular Normativa. 2004.
61. Modell B, Khan M, Darlison M, Westwood M, Ingram D, Pennell D. Improved survival of thalassaemia major in the UK and relation to T2\* cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2008;10(42):1–8.
62. Telfer PT. Update on survival in thalassemia major. *Hemoglobin.* 2009;33(May):76–80.
63. Weatherall DJ. The challenge of haemoglobinopathies in resource-poor countries. *Br J Haematol.* 2011;154(6):736–44.
64. Ma H, Marti-Gutierrez N, Park S, Wu J, Lee Y, Suzuki K, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature.* 2017;0:1–24.

65. Yi J, Moertel C, Baker K. Homozygous alfa-Thalassemia Treated with Intrauterine Transfusions and Unrelated Donor Hematopoietic Cell Transplantation. *J Pediatr.* 2009;154(5):766–8.