

Artigo / Article

Análise quantitativa e molecular de hemoglobina fetal em indivíduos da população brasileira

Quantitative and molecular analysis of fetal hemoglobin in individuals from the brazilian population

Paula J. A. Zamaro¹
Cláudia A. Hidalgo²
Cláudia R. Bonini-Domingos¹

A hemoglobina fetal - Hb F, formada por duas cadeias gama e duas cadeias alfa, é característica do período fetal do desenvolvimento, tendo sua síntese diminuída no período pós-natal. Em algumas alterações hereditárias, a Hb F permanece aumentada, como nas delta-beta talassemia, beta talassemia e persistência hereditária de Hb F (PHHF). A síntese da globina gama também pode ser estimulada por fatores externos como leucemias, transplantes de medula óssea, induções químicas, dentre outros. Através da observação de Hb F aumentada em doadores de sangue por procedimentos eletroforéticos objetivou-se avaliar a quantidade de Hb F em amostras de sangue de candidatos à doação, visando estabelecer seus limites de normalidade na população de São José do Rio Preto e região, por meio de desnaturação alcalina e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), comparar as metodologias aplicadas e, nos indivíduos com Hb F aumentada, realizar estudos moleculares para identificar as mutações que alteram a expressão dos genes gama. Foram analisadas 208 amostras de sangue, sendo 119 de candidatos à doação e 89 de indivíduos sem sintomas de anemia ou achados hematológicos e com Hb F aumentada como grupo comparativo. Das 119 amostras de candidatos à doação, 110 foram utilizadas para traçar o perfil de normalidade de Hb F, comparando-se as metodologias de desnaturação alcalina e HPLC, onde se obteve a média de 1,48% e de 0,6%, respectivamente. A análise estatística por regressão linear mostrou diferença significativa na comparação entre as duas metodologias aplicadas, sendo a HPLC mais precisa para a quantificação de Hb F. Foram observados nos testes de rastreamento de hemoglobinas anormais nestas 110 amostras de sangue: 16,4% de alfa talassemia, 0,9% com Hb F aumentada, 0,9% com beta talassemia e 0,9% com hemoglobina variante de cadeia delta. Os outros nove doadores de sangue apresentaram Hb F acima de 10% em eletroforese e observou-se média de 32,28% para desnaturação alcalina e de 26,4% para HPLC. As análises moleculares por PCR-ASO foram realizadas na tentativa de

¹ Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas – Departamento de Biologia – Ibilce/Unesp. São José do Rio Preto, SP.

² Instituto de Química – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Unesp – Araraquara, SP.

Correspondência para: Ms. Paula Juliana Antoniazzi Zamaro

Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas – LHGDH – Ibilce – Unesp.
Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jd. Nazareth
15054-000 – São José do Rio Preto-SP
Tel.: (17) 221-2392 – Fax: (17) 221-2390 – email: paula.z@lycos.com

se identificar um defeito genético que pudesse explicar o aumento de Hb F, pelo rastreamento de 16 mutações que originam talassemias do tipo beta. Encontraram-se 5,3% de heterozigotos para mutação CD6-A e 1,75% para as mutações CD 39, IVS1:6, -87 e IVS2:654, todas em heterozigose. Os resultados encontrados neste estudo evidenciam a necessidade de melhor caracterização dos perfis de hemoglobina obtidos pelos métodos clássicos e a importância de sua caracterização molecular. Rev. bras. hematol. hemoter. 2003;25(4):223-229.

Palavras-chave: Hemoglobina fetal; hemoglobinas anormais; diagnóstico molecular.

Introdução

A hemoglobina fetal (Hb F) é formada por duas cadeias alfa e duas cadeias gama, característica do período fetal do desenvolvimento, com expressão dos genes γ^G e γ^A , pertencentes à família da beta-globina humana, localizados no braço curto do cromossomo 11.¹ Os genes da família beta atuam em diferentes fases do desenvolvimento, ocorrendo redução na síntese de Hb F após o nascimento. Em adultos normais, a Hb F representa menos de 1% das hemoglobinas totais, com porcentagem média de 0,4%. O perfil de hemoglobinas normais no adulto é de Hb A: 96% – 98% e Hb A₂: 2,5% – 3,5% e Hb F de 0% – 1%.^{1,2}

Em algumas alterações hereditárias, a Hb F permanece aumentada, como nas delta-beta talassemias, caracterizadas pela redução na síntese ou ausência das cadeias delta e beta, com conseqüente aumento de Hb F; nas beta talassemias, onde há redução da síntese de cadeias beta com aumento das hemoglobinas A₂ e fetal, e nas persistências hereditárias de Hb F (PHHF), alteração genética caracterizada pela contínua produção de Hb F na vida adulta.^{2,3,4}

A síntese da globina gama também pode ser estimulada por fatores externos como as leucemias, transplantes de medula óssea, induções químicas, dentre outras.^{5,6} A Hb F influencia também a manifestação clínica de outras hemoglobinopatias, por sua afinidade aumentada ao oxigênio, melhorando os sintomas apresentados.²⁻⁶ A partir de achados eletroforéticos de Hb F aumentada em doadores de sangue, objetivou-se avaliar a quantidade de Hb F em amostras de sangue de candidatos à doação, visando estabelecer os limites de

normalidade para população de São José do Rio Preto e região, por meio de desnaturação alcalina e HPLC, comparando-se as metodologias aplicadas; nos indivíduos com Hb F aumentada, realizar estudos moleculares para identificar as mutações que alteram a expressão dos genes gama.

Casística e Métodos

Foram analisadas 208 amostras de sangue venoso, colhidas com EDTA 5% como anticoagulante, após consentimento informado, provenientes de indivíduos de ambos os sexos, sem restrição de etnia e com idades variáveis, sendo excluídas as crianças até um ano de idade, de indivíduos saudáveis, sem sinais ou sintomas de talassemias e colhidos aleatoriamente.

Destas amostras, 119 foram de candidatos a doação de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto e Hemonúcleo de Fernandópolis e 89 de indivíduos pertencentes a programas populacionais de rastreamento de hemoglobinas desenvolvidos pelo Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, (LHGDH), Ibilce – Unesp. Ao chegarem ao laboratório, as amostras foram codificadas para se preservar a identidade dos indivíduos, e submetidas aos testes seletivos e específicos para a determinação do perfil de hemoglobinas. A avaliação dos parâmetros hematológicos foi realizada por procedimentos automatizados, seguindo os padrões de controle de qualidade.

Na triagem para hemoglobinopatias foram utilizadas as metodologias de: Resistência Globular Osmótica em NaCl a 0,36%, teste seletivo para beta talassemia heterozigota⁷; Análise da Morfologia

Eritrocitária a Fresco, onde foram avaliados tamanho, forma e conteúdo de hemoglobina dos eritrócitos⁸ e Eletroforese em pH alcalino, utilizada para qualificação e quantificação de hemoglobinas normais e anormais.⁹ Para confirmação das alfa talassemias foram realizados: Eletroforese em pH neutro, técnica utilizada especificamente para qualificação e quantificação de Hb H e Bart's,¹⁰ e Pesquisa Intra-eritrocitária de Corpos de Hb H, onde, após coloração dos eritrócitos com azul cresil brilhante, visualiza-se a presença dos corpos de inclusão.¹¹ A confirmação de hemoglobinas variantes realizou-se através da eletroforese em pH ácido, específica para diferenciar alguns tipos de hemoglobinas que migram em posição semelhante no pH alcalino.¹²

A Hb F foi quantificada pelas metodologias de Desnaturação Alcalina¹⁵ e Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC), no sistema VARIANT (Bio-Rad Laboratories) com kit para beta talassemia heterozigota, segundo os protocolos estabelecidos pelo fabricante.

A extração de DNA foi realizada com kit Instagene Genomic (Bio-Rad Laboratories) e as amostras foram submetidas às análises por reação em cadeia de polimerase (PCR) em associação com a técnica de sonda oligonucleotídica alelo específica (ASO), com os kits para diagnóstico de beta talassemia da linha mDx™ da Bio-Rad Laboratories. Foram rastreados 16 mutantes para beta talassemia, sendo oito de origem mediterrânea: CD 39; IVS1:110; IVS1:6; IVS1:1; IVS2:745; -87; CD6 - A, e oito de origem asiática: CD 41-42; CD 17; -28; IVS2:654; CD 19; IVS1:5; CD 71-72 e Hb E, seguindo os protocolos fornecidos pelo fabricante.

Resultados

As 208 amostras de sangue foram divididas em três grupos de análise, sendo: 110 de doadores de sangue utilizadas para traçar a curva de normalidade para Hb F, e comparação das metodologias de análise como a desnaturação alcalina e HPLC; nove amostras de sangue de doadores com Hb F aumentada, separados do grupo dos outros 110 por apresentarem Hb F aci-

ma de 10%, e 89 amostras de sangue de indivíduos sem sintomas de anemia ou achados hematológicos e com Hb F aumentada.

Nas 110 amostras aleatórias de candidatos à doação, considerados saudáveis, sem sinais e sintomas de anemias, submetidas aos teste de triagem e confirmação para hemoglobinopatias, foram encontrados fenótipos de hemoglobinas anormais sendo: 16,4% com alfa talassemia, 0,9% portadores de beta talassemia, 0,9% com Hb AF e 0,9% portadores de Hb AB2, uma variante de cadeia delta, que migra mais lentamente do que a Hb A₂ em eletroforese alcalina e apresenta o mesmo padrão de migração em focalização isoeletrica.¹⁶ É a variante de cadeia delta mais comum, encontrada principalmente em afro-descendentes.^{6,8,13} Merece destaque, no entanto, a frequência de 16,4% de portadores de alfa talassemia. A figura 1 ilustra a distribuição de hemoglobinas anormais neste grupo.

As amostras de sangue deste grupo de doadores foram utilizadas para traçar o perfil de normalidade para Hb F, comparando-se as metodologias de desnaturação alcalina, método tradicional e amplamente utilizado para quantificação de Hb F, e a HPLC. Os valores médios de Hb F obtidos por desnaturação alcalina e HPLC foram de 1,48% e 0,6%, respectivamente. Os resultados encontrados para a metodologia de desnaturação alcalina mostraram-se discordantes do perfil obtido em outras análises de hemoglobinas, como a eletroforese alcalina e cromatografia, e superior ao va-

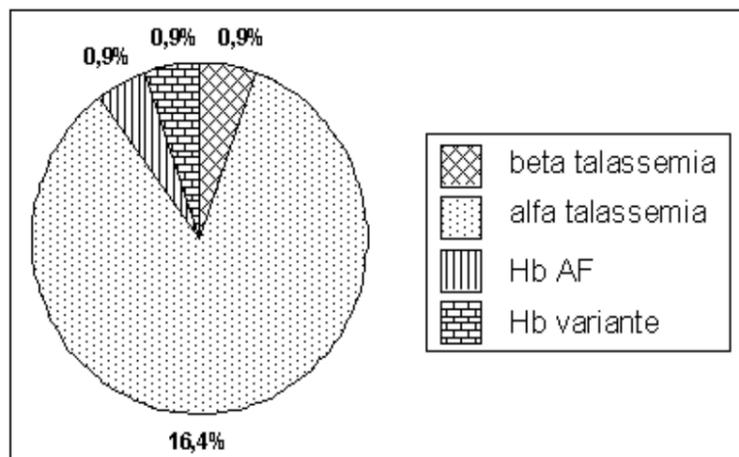


Fig. 1- Gráfico ilustrando os resultados das hemoglobinas anormais obtidos nos procedimentos de triagem e confirmação de hemoglobinopatias em um grupo de 110 amostras sangue

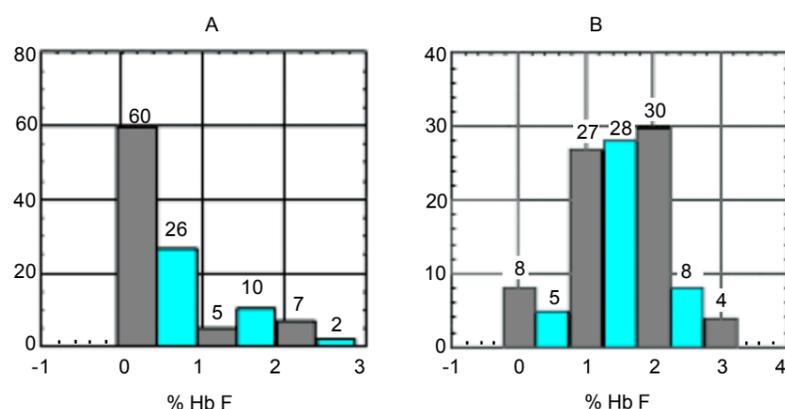


Fig. 2 – Os histogramas A e B, obtidos a partir do programa Statdisk, evidenciam a distribuição dos valores em porcentagem para Hb F, encontrados pelas metodologias de HPLC e desnaturação alcalina, respectivamente

lor médio percentual preconizado, pela literatura, de 0,4%,⁶ valor este muito próximo ao obtido pela HPLC, 0,6%. Esta diferença foi confirmada como significativa pelos testes estatísticos de hipótese da média e regressão linear (α 0,01). A figura 2 ilustra os histogramas observados entre as duas metodologias utilizadas na quantificação de Hb F, evidenciando a precisão da HPLC através da distribuição dos valores em porcentagem para Hb F.

A presença da Hb F acima de 10% em nove doadores de sangue foi obtida por meio dos resultados conjuntos nos procedimentos de triagem e testes complementares para a identificação de hemoglobinopatias. Dentre os resultados encontrados, destaca-se o perfil de Hb AF associado à alfa talassemia em 44,4% das amostras. Também foram realizadas as dosagens de Hb F por desnaturação alcalina e HPLC com valores médios de 32,28% e 26,42%, respectivamente. Para afastar a possibilidade de herança conjunta com talassemias do tipo beta, estas amostras foram submetidas a análises moleculares por PCR-ASO, com os kits mDx Beta para diagnóstico de beta talassemia, e apresentaram resultados normais para os 16 mutantes avaliados.

Outras 89 amostras de sangue provenientes de programas preventivos para hemoglobinopatias, cujos indivíduos não apresentavam sintomas de anemia e com Hb F acima dos valores de normalidade, vieram de diferentes estados do País, sendo maior a frequência de amostras originárias do estado de São Paulo, pareando nosso estudo. Os resultados dos testes para hemoglobinopatias mostraram associação de Hb AF com alfa talassemia

em 42,7% das amostras. A quantificação de Hb F neste grupo foi realizada pela metodologia de HPLC com média percentual de 6,77%.

As amostras foram submetidas a análises moleculares por PCR-ASO, onde avaliou-se a presença de 16 mutantes de cadeia beta que determinam talassemias, sendo oito de origem mediterrânea, onde foram encontrados em heterozigose 5,3% de CD6-A, 1,75% de CD39, 1,75% de IVS1:6 e 1,75% de -87. Dentre os oito mutantes de origem asiática, encontrou-se 1,75% de

freqüência para a mutação IVS2:654, em heterozigose.

Discussão

As Hb F e Hb A₂ são componentes clinicamente importantes para o diagnóstico e acompanhamento dos distúrbios de hemoglobinas. As metodologias aplicadas para suas quantificações evoluíram nos últimos anos, tornando-se rápidas e precisas. A combinação de diferentes genótipos de hemoglobinas influenciam o fenótipo e a correta determinação dos parâmetros de análises, fundamentais para o aconselhamento genético e direcionamento clínico.^{17,18}

A persistência da Hb F após os seis meses de idade pode ser influenciada por defeitos genéticos ligados aos genes gama, associações com algumas hemoglobinopatias ou fatores ambientais. A Hb A₂ aumentada é um dos melhores marcadores biológicos para o diagnóstico de beta talassemia heterozigota, no entanto, sua concentração pode ser influenciada pela associação com outros defeitos globínicos, deficiência de ferro e processos infecciosos.^{1,2,4,17}

As amostras de sangue de doadores do presente estudo, avaliadas por metodologias eletroforéticas, cromatográficas e citológicas, evidenciaram a necessidade de ampliação das metodologias aplicadas para a identificação rotineira de alterações de hemoglobinas que devem ser rastreadas nesse grupo de indivíduos. Além de Hb F aumentada, foram encontrados fenótipos talassêmicos, sendo 16,4% de alfa talassemia.

Nas 110 amostras de sangue de doadores submetidas a quantificação de Hb F pelos métodos de desnaturação alcalina e HPLC obteve-se uma média percentual de 1,48% para desnaturação alcalina e 0,6% para HPLC. A comparação dos valores quantitativos obtidos nas duas metodologias mostrou que a HPLC apresentou valores mais próximos dos perfis normais obtidos para diferentes populações e compatível com o perfil eletroforético de cada uma das amostras analisadas, além de ser uma metodologia automatizada, reprodutível e que permite a análise de uma grande quantidade de amostras em curto espaço de tempo.^{2,6,15,19,20}

Os nove doadores de sangue que apresentaram valores de Hb F aumentada, identificados por procedimentos eletroforéticos e cromatográficos, mostraram, no conjunto dos testes para diagnóstico de hemoglobinopatias, perfil compatível com provável heterozigose para PHHF (Hb AF).²

As PHHF delecionais em heterozigose são caracterizadas por um aumento de Hb F entre 15% e 30%, resultante de deleções parciais envolvendo os genes δ e β , semelhante aos achados laboratoriais destes nove doadores.¹⁶ Os perfis moleculares avaliados com o rastreamento de 16 mutações para talassemia mostraram-se negativos.

Amostras de sangue de 89 indivíduos com perfil eletroforético de Hb F aumentada, mas sem anemia ou sintomas clínicos, foram incluídas no estudo a título de comparação. A maior frequência foi de amostras oriundas do estado de São Paulo, através de programas de estudos populacionais, de indivíduos com idade a partir de um ano, fase em que a Hb F já apresenta valores compatíveis com a idade adulta, devido à diminuição na síntese de cadeias gama.⁶ A média percentual de Hb F, para este grupo, foi de 6,77%. O valor encontrado estava muito acima do obtido pela mesma metodologia, nas 110 amostras de doadores de sangue avaliadas para traçar o perfil de normalidade para Hb F na região de São José do Rio Preto, que foi de 0,6%. A Hb A₂, cujo aumento é indicativo de beta talassemia heterozigota, apresentou média percentual de 2,7%, estando dentro dos limites de normalidade, não indicando, portanto, talassemia do tipo beta pelas metodologias clássicas de análise.^{2,6,8,13}

Estudos moleculares em heterozigotos para beta talassemia mostraram que, geralmente, a Hb F encontra-se entre 2,0% e 2,5%. Alguns fatores podem interferir e influenciar o aumento de Hb F,

como as mutações beta talassêmicas, seu "background" cromossômico, variações nos promotores dos genes γ e diferentes genótipos de alfa globina associados.²¹

Na tentativa de se identificar o defeito genético que justificasse o aumento de Hb F nos indivíduos sem sintomas clínicos ou anemias incluídos no grupo comparativo, avaliaram-se, por PCR-ASO, mutações de origem mediterrânea e asiática que ocasionam beta talassemia. Os resultados obtidos mostraram a presença de mutantes CD6-A, CD 39, IVS1:6, -87 e IVS2:654, todos em heterozigose. São raros os relatos, na população brasileira, para os mutantes CD6-A de origem mediterrânea e IVS2:654 de origem asiática, em especial para a região sudeste. Os valores obtidos para as frequências dos mutantes, acima descritos, são discordantes dos dados da literatura, que mostram o mutante CD 39 como o mais frequente para a população desta região do Brasil.^{21,22,23}

Conclusões

Os resultados obtidos evidenciaram a importância da associação de metodologias na triagem de hemoglobinopatias em candidatos à doação de sangue. Apesar de apresentarem valores de hematócrito que os admitia para a doação, nos indivíduos testados foram encontradas, além da Hb F aumentada, fenótipos talassêmicos com destaque para as alfa talassemias, confirmadas para 16,4% das amostras triadas.

Na comparação das metodologias para a quantificação de Hb F, a HPLC mostrou-se mais eficiente do que a desnaturação alcalina, estabelecendo o perfil de normalidade da Hb F em valor percentual médio de 0,6% para este grupo da população de São José do Rio Preto e região, valor este bem próximo ao preconizado, pela literatura, de 0,4%. Nas análises moleculares dos indivíduos com Hb F aumentada, onde foram avaliados defeitos genéticos que originam beta talassemia, destacaram-se os achados dos mutantes CD6-A (5,3%) de origem mediterrânea e IVS2:654 (1,75%) de origem asiática.

Os resultados globais deste estudo evidenciaram a necessidade de melhor caracterização dos perfis de hemoglobina obtidos pelos métodos clássicos, e a importância da caracterização molecular destes defeitos que refletem a diversidade genética da população brasileira.

Abstract

The fetal hemoglobin, Hb F, formed by two alpha and two gamma globin chains, is characteristic of the fetal development period and has diminished synthesis in the post-natal period. In some hereditary alterations Hb F remains elevated, as in delta-beta thalassemia, beta thalassemia and hereditary persistence of Hb F (HPFH). The synthesis of gamma globin can also be stimulated by external factors including leukemia, blood marrow transplantation and chemical induction, amongst others. Through the observation of elevated levels of Hb F in blood samples using electrophoretic procedures, we aimed at evaluating the amount of Hb F in blood donor samples in order to establish limits of normality in the population from São José do Rio Preto and region. Also using alkaline denaturation and high-pressure liquid chromatography (HPLC), we compared the applied methodologies and, in individuals with increased Hb F, we used molecular studies to identify mutations that modify the gamma globin gene expression. Blood samples from 119 donation candidates and, as a control group, 89 from individuals without symptoms of anemia or hematological findings and with increased Hb F, were analyzed. Of these 119 samples from blood donation candidates, 110 were used to trace the profile of normal Hb F, comparing the applied measurement methodologies, giving an average of 1.48% for alkaline denaturation and 0.6%, for HPLC. Statistical analysis using linear regression showed a significant difference between the two applied methodologies. HPLC was the best method to measure Hb F. In the 110 blood samples that were evaluated in the screening tests for abnormal hemoglobins 16.4% presented with alpha thalassemia, 0.9% with increased Hb F, 0.9% with beta thalassemia and 0.9% with a hemoglobin variant of the delta globin chain. The other nine blood donors presented with Hb F levels above 10% in electrophoresis with an average of 32.28% observed in alkaline denaturation and 26.4% in HPLC. Molecular analysis by PCR-ASO was carried out, screening the 16 mutations that give rise to beta-type thalassemia, in an attempt to identify a genetic defect that could explain the increase of Hb F. We found 5.3% of heterozygotes with the CD 6-A mutation and 1.75% with the CD 39, IVS1:6, -87 and IVS2:654 mutations. The results in this study suggested a necessity of better characterization of the hemoglobin profiles obtained by the classic methods and the importance of its molecular characterization. Rev. bras. hematol. hemoter. 2003;25(4):223-229.

Key words: Fetal Hemoglobin; abnormal hemoglobins; molecular diagnosis.

Referências Bibliográficas

- Honig GR, Adams III JG. Human hemoglobin genetics. Wien: Springer, 1986.
- Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes. Blackwell Scientific Publications. 3^a ed., p. 859, 1981.
- Forget BG et al. Absence of messenger RNA and gene DNA for β -globin chains in HPFH. Cell 1976;7:323-9.
- Constantoulakis P et al. Locus control region- $\Delta\gamma$ transgenic mice: a new model for studying the induction of fetal hemoglobin in the adult. Blood 1991; 77:1.326-33.
- Shimizu K et al. Elevated haemoglobin F in juvenile and adult chronic myelogenous leukaemia. Acta Haematol 1988;80:28-33.
- Nagel RL, Labie D. DNA haplotypes and the β^s globin gene. Hemoglobin Switching 1989;371-93.
- Silvestroni E, Bianco I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. Am J Hum Genet 1975;27:198-212.
- Bonini-Domingos CR. Hemoglobinopatias no Brasil: variabilidade genética e metodologia laboratorial. São José do Rio Preto, 1993. Tese (Doutoramento em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.
- Marengo-Rowe AJ. Rapid electrophoresis and quantification of haemoglobin on cellulose acetate. J Clin Path 1965;18:90-192.
- Dacie JV & Lewis SM. In: Practical Haematology, 6th ed. Churchill, London, p.516, 1985.
- Papayannopoulos R, Stamatoyannopoulos G. Stains for inclusions bodies. In: Standardization of Laboratory Reagents and Methods for Detection of Haemoglobinopathies. Atlanta: Hew publications, 1974.
- Vella F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobins. Am J Clin Path 1968;49:440.
- Naoum PC. Eletroforese, técnicas e diagnósticos. São Paulo: Santos, 1998.
- Schneider RG. Differentiation of electrophoretically hemoglobins - such as S, D, G and P or A2, C, E, and O - by electrophoresis of the globin chains. Clin Chem 1974;20:1.111-5.
- Betke K, Marti NR, Schlicht I. Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. Nature 1959;184: 1877.
- <http://globin.cse.psu.edu/> acesso em 20/04/2002.
- Cotton F, Lin C, Fontaine B, Gulbis B, Janssens J, Vertongen F. Evaluation of a capillary electrophoresis method for routine determination of hemoglobins A₂ and F. Clin Chem 1999;45:237-43.

18. Huisman THJ. Combinations of chain abnormal hemoglobins with each other or with b-thalassemia determinants with known mutations: influence on phenotype. Clin Chem 1997;43:1.850-6.
19. Tan GB, Aw TC, Dunstan RA, Lee SH. Evaluation of high performance liquid chromatography for routine estimation of haemoglobins A₂ and F. J Clin Pathol 1993;46:852-6.
20. Eastman JW, Wong R, Liao CL, Morales DR. Automated HPLC screening of newborns for sickle cell anemia and other hemoglobinopathies. Clin Chem 1996;42:704-10.
21. Vrettou C et al. Molecular studies of beta-thalassemia heterozygotes with raised Hb F levels. Hemoglobin. 2000;24:203-20.
22. Fonseca SF, et al. Genetic analysis of beta-thalassemia major and beta-thalassemia intermediate in Brazil. Hemoglobin 1998;22:197-207.
23. Moreira HW, de Oliveira CM, Martins CS, de Sales TS, Costa FF. Determination of neutral polymorphisms (frameworks) of the human beta globin gene in beta thalassemia by PCR/DGGE. Sangre 1997;42:21-4.

Avaliação:

Editor e dois revisores

Conflito de interesse:

A Bio-Oxford, Bio-Rad forneceu os kits para o diagnóstico e realização do trabalho.

Financiamento do projeto: Capes**Recebido:** 29/11/2002**Aceito após modificações:** 11/04/2003