

BC/20186
IB/81183

Silvia Regina Pergamo de Miranda

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
SILVIA REGINA PERGAMO
DE MIRANDA
e aprovada pela Comissão Julgadora.

27/9/93



**ALTERAÇÕES DO GENE DA GLOBINA β EM HEMOGLOBINOPATIAS
ESTRUTURAIS E TALASSÊMICAS NO BRASIL**

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

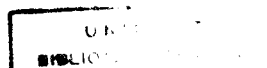
Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas, para a
obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas, Área de Genética Médica

Campinas

- 1993 -

T/UNICAMP

M672_a



UNIDADE	IB		
N.º CHAMADA:	T/297		
	M672a		
V.	Ex.		
TCMBO BC/	20186		
PROC.	26193		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	CR\$ 800,00		
DATA	05/01/94		
N.º CPD	cm 005.2459-8		

Dedico,

Ao meu orientador, Dr. Fernando F. Costa,
Por tudo! (descrever esse tudo, por mais que
eu me lembrasse seria pouco).

A Deus,

Por tudo!

(esse tudo, quem dera eu conhecer!...)

Ofereço,

Ao meu pai que, se pudesse,

se orgulharia...

Agradeço,

Com especial carinho, ao Dr. Fernando F. Costa, pela orientação, pelos ensinamentos, pelo exemplo de dedicação, pela confiança, compreensão, amizade e pela inestimável solidariedade em todos os momentos difíceis.

À Dra. Sara T.O. Saad, pelas relevantes questões levantadas no exame prévio e no curso do trabalho, pelo convívio agradável, amizade, e especialmente... pela recuperação de géis desenganados.

À Dra. Helena Z. W. Grotto, pelas valiosas sugestões apresentadas durante a arguição prévia e pelo carinho dispensado em todas as ocasiões.

Ao Dr. Haroldo W. Moreira, pela solicitude em todas as dúvidas e pelas sugestões apresentadas na análise prévia deste trabalho.

À Dra. Marileila V. Garcia, pela força nos primeiros passos, pela imensa admiração e amizade que ficaram, pelo exemplo de postura científica e pela participação na banca examinadora.

À Dra Christine Hackel, por todas as valiosas sugestões e pelo carinho de sempre.

Ao Dr. Antonio Sérgio Ramalho, pelos ensinamentos e participação na banca examinadora.

Ao Hemocentro da UNICAMP, à FAPESP e ao CNPq, pelo suporte financeiro.

Aos pacientes, que deram seu sangue para que o trabalho pudesse ser realizado.

À querida Marilda G. Souza, pela alegria, força e amizade de sempre (além de contribuições importantes para a realização do trabalho).

À Mônica B. Melo, companheira a toda prova, pela grande amizade! que dispensa qualquer comentário, é... nem sei o que dizer... Beijão! Valeu!

À Dra. Carmem S.B. Martins, pelo exemplo de ser humano especial, pela adoção em diversos momentos, minha eterna gratidão...

Aos colegas: Valder (principalmente pelos papos "cabeça"), Aranha, Afonso, Kátia, Maristela, Patricia, Tereza, Lena, Dilmara, Simone, Carlos, Adriana, Fábio, Henry, Paulinho, Sonia, Isa, Edi, Janete, Mada, Lili, Neiva, Sandra, pela convivência, sugestões, auxílios e ótima amizade.

A companheira Elza M. Kimura e à Dra. Maria de Fátima Sonati, pelos dados hematológicos e grande amizade.

Ao Dr. J. Kerbauy, Dra. Maria Stela Figueiredo e D. Rosa pela colaboração na casuística.

Ao Dr. Stephen H. Embury e à Pranne, pelo aprendizado em São Francisco.

À Super Malu e à Celinha, pela incansável amizade e pela genialidade de seus programas maravilhosos...

Ao Dean, pela dedução da fórmula de como ser "Cool", embora fórmulas nem sempre tenham sido meu forte, além do amor e força, é claro...

À Dna. Walkiria, que continua sendo a MELHOR MÃE DO MUNDO! apesar das vaciladas...

E a todas as pessoas que fizeram parte da minha vida durante o período de realização deste trabalho, e que contribuíram para o meu engrandecimento como pessoa.

Muito Obrigada!

Índice

Introdução	1
A molécula da globina	2
Os genes das globinas	5
Hemoglobinas Humanas Variantes	10
Bases genéticas das variantes de hemoglobina	12
Algumas hemoglobinas variantes	13
Hemoglobinas Instáveis	19
Síndromes Talassêmicas	22
Casuística	28
Métodos	30
Análise Hematológica	30
Análise Molecular	32
Resultados	44
Discussão	81
Conclusões	97
Resumo	99
Summary	100
Referências Bibliográficas	101

INTRODUÇÃO

As alterações hereditárias das hemoglobinas humanas, ou hemoglobinopatias, ocupam, por razões várias, posição única na Genética Médica. Representam um dos grupos de doenças genéticas mais comuns na espécie humana, além de estarem associadas a substancial morbidade. Dados da Organização Mundial da Saúde estimam que aproximadamente 5% da população mundial é constituída por portadores de genes para alterações das hemoglobinas com componente clínico importante, e que cerca de 1/3 de milhão de nascimentos anuais são homozigotos ou heterozigotos (WHO, 1982; Weatherall *et al.*, 1989).

As alterações moleculares da hemoglobina talvez sejam as mais conhecidas dentre as doenças genéticas, como consequência direta da hemoglobina ser uma das primeiras proteínas a ter sua estrutura deduzida (Perutz, 1987), e os genes da globina humana serem os primeiros, relacionados a doenças, a serem clonados.

Todo o conhecimento derivado destes estudos iniciais revelou-se de fundamental importância no desenvolvimento não só da Genética Médica, como também na compreensão de mecanismos subjacentes à expressão gênica normal. A título de exemplo, importa citar que uma das primeiras aplicações clínicas da Biologia Molecular foi o uso, por Kan e Dozy (1978), do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) no diagnóstico pré-natal da anemia falciforme. Além disso, a investigação das anormalidades das globinas propiciam dados para compreensão do processo evolutivo, tanto ao nível molecular, quanto populacional, e constitui um modelo de estudo da expressão gênica durante o desenvolvimento.

A molécula de hemoglobina

Em 1865, muito tempo antes de qualquer proteína ter sido isolada como uma substância pura, Kuhne propôs que os componentes que se ligam ao oxigênio nos músculos e no sangue - hoje conhecidos como mioglobina e hemoglobina - eram muito relacionados, senão idênticos. Um século mais tarde, Max Perutz determinou a estrutura da hemoglobina através de cristalografia de raios-X (Stamatoyannopoulos, 1987).

Cada subunidade da hemoglobina é virtualmente idêntica à mioglobina. A similaridade estrutural entre estas duas moléculas constitui forte evidência de que a mioglobina e a hemoglobina, atualmente conhecidas, se desenvolveram de uma proteína ancestral comum. As estruturas primárias da mioglobina e hemoglobina, isoladas de várias espécies, foram determinadas. As seqüências de cadeias α de 60 espécies são idênticas em 23 de suas 141 posições, e as seqüências de cadeias β são idênticas em 20 de suas 146 posições (Rawn, 1989).

Originalmente havia somente um gene codificando a proteína que se liga ao oxigênio, chamada globina. Possivelmente, o pareamento desigual de cromossomos homólogos e recombinação do material genético originou um cromossomo com dois genes de globina. O acúmulo de mutações em cada gene duplicado conduziu a uma evolução independente da família de proteínas derivada da mesma globina ancestral (Bunn & Forget, 1986).

A hemoglobina é a proteína transportadora de oxigênio, presente nos eritrócitos de vertebrados, mas também encontrada em alguns invertebrados e em nódulos de raízes leguminosas. A molécula é tetramérica e constituída por duas cadeias de globina α e duas cadeias de globina β , mantidas como estrutura estável através da ação de pontes de hidrogênio. Na hemoglobina normal de adulto (hemoglobina A, ou Hb A) estas cadeias se acoplam para formar um tetrâmero globular, com peso molecular de aproximadamente 64500 daltons (Figura 1). Cada cadeia contém uma molécula heme, produto de uma complexa via enzimática que origina um composto orgânico tetracíclico. Juntamente com o ferro, a molécula do heme liga o oxigênio molecular, conferindo à hemoglobina a capacidade de transportar oxigênio (Dickerson, 1983).

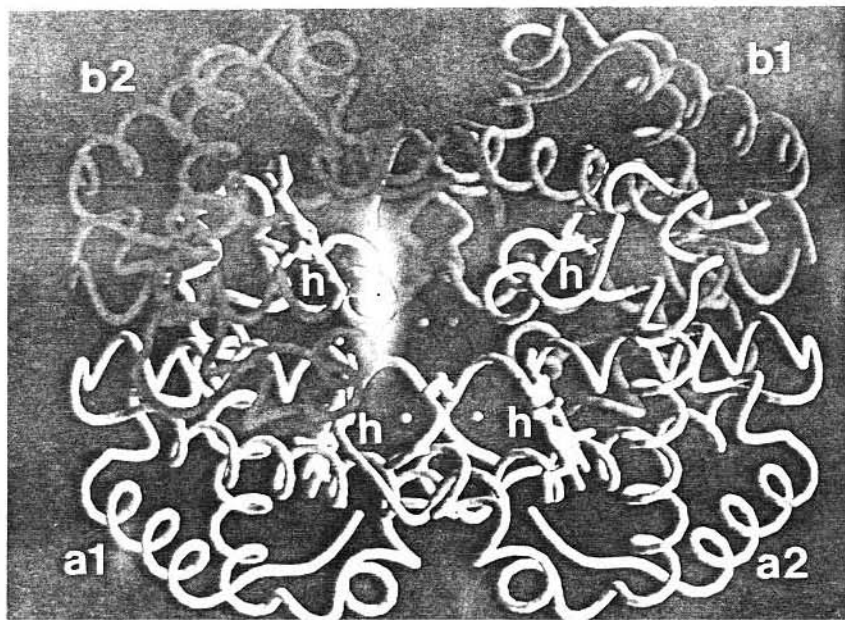


Figura 1. Representação de uma molécula tetramérica $\alpha_2\beta_2$ da hemoglobina normal de adulto. a. cadeia α ; b. cadeia β ; h. grupo heme (Substituições nas interfaces das subunidades podem alterar a afinidade pelo oxigênio ou a estabilidade da molécula) (Rawn, 1989).

A estrutura terciária do polipeptídeo da globina é conservada a despeito da divergência de seqüência de aminoácidos observada entre as diferentes espécies. Somente 2 resíduos de aminoácidos foram conservados quando comparadas todas as globinas conhecidas. Cerca de 35 outros sítios internos são quase invariavelmente ocupados por resíduos não-polares, formando uma região hidrofóbica no interior da molécula. Em contraste, resíduos polares tendem a se arranjar na superfície da molécula, em contato com a água. Substituições de aminoácidos que mudam a polaridade destes resíduos são, em geral, deletérias e portanto, aparentemente não são conservadas pelo mecanismo da evolução (Bunn & Forget, 1986).

Eritrócitos humanos adultos contêm 96 a 98% de Hb A ($\alpha_2\beta_2$), até 3% de HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) e 1% ou menos de HbF ($\alpha_2\gamma_2$). A produção eficiente das globinas α e β resulta em aproximadamente 30 pg de hemoglobina por eritrócito. A globina δ é muito similar à globina β em estrutura, e parece ter propriedades funcionais idênticas. O baixo nível de globina δ , comparado com globina β , reflete várias características da estrutura e expressão do gene responsável pela produção desta cadeia. Seu promotor é defeituoso e sua transcrição ocorre em taxa menor que no gene β (Maniatis *et al.*, 1980).

As hemoglobinas embrionárias Gower 1, Gower 2 e Portland são constituídas por tetrâmeros compostos por $\zeta_2\epsilon_2$, $\alpha_2\epsilon_2$ e $\zeta_2\gamma_2$, respectivamente. Eritrócitos embrionários, nos quais estas hemoglobinas predominam, têm afinidade por oxigênio similar àquela de células do cordão umbilical e uma curva de dissociação de oxigênio sigmóide, indicativa de cooperatividade entre as subunidades (Stamatoyannopoulos, 1987).

A descoberta por Korber, em 1866, que hemolisados de eritrócitos de recém-nascidos eram resistentes a desnaturação alcalina sugeriu a existência de uma hemoglobina estruturalmente distinta. Estudos subseqüentes permitiram o isolamento e caracterização da hemoglobina fetal humana (HbF). O baixo nível de HbF encontrado em eritrócitos normais de adultos após o período perinatal reflete a regulação coordenada dos genes γ e β (Schroeder, 1980; Huisman, 1981).

Os genes das globinas

A partir do estudo de hemoglobinas normais e anormais e seus padrões de herança foi possível delinear-se um quadro geral do número e arranjo dos genes humanos da globina normal. Estes dados foram obtidos anteriormente ao conhecimento preciso da organização do gene da globina derivado dos procedimentos de mapeamento gênico e clonagem. O modelo assim estruturado requeria a existência de pelo menos um gene diferente para cada uma das cadeias de globina: α , β , γ , δ , ϵ e ζ . Do estudo das variantes e análise da heterogeneidade bioquímica das cadeias γ na hemoglobina fetal demonstrou-se que os genes α e γ eram duplicados (Mckusick, 1990).

O estudo do padrão de herança em indivíduos com variantes de cadeias α e β sugeria que os genes α e β deveriam estar em diferentes cromossomos ou, pelo menos, muito separados em um mesmo cromossomo (Bunn & Forget, 1986). A análise de células somáticas híbridas de Rodentia e humanos, contendo somente um, ou poucos cromossomos humanos permitiu a Deisseroth e colaboradores estabelecerem claramente que os genes humanos da globina α e β residiam em diferentes cromossomos: os genes α no cromossomo 16, e os genes β no cromossomo 11 (Deisseroth *et al.*, 1976, 1977, 1978). Estes resultados foram obtidos com ensaios de hibridização líquida de DNA (ácido desoxirribonucleico) celular total de várias células somáticas híbridas, hibridizadas com cDNA radioativo sintetizado a partir de RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) de globina α e β , pela enzima transcriptase reversa (AMV) (Gusella *et al.*, 1979; Jeffreys *et al.*, 1979; Lebo *et al.*, 1979). Esses dados foram mais tarde confirmados e ampliados por vários grupos de investigadores com o emprego de mapeamento gênico, pelo método de Southern, com DNA de várias linhagens celulares híbridas contendo diferentes translocações ou deficiências dos cromossomos envolvidos. Estes estudos conduziram à localização regional dos "loci" gênicos da globina em seus respectivos cromossomos; o grupo do gene β no terço distal do braço curto do cromossomo 11, e o grupo gênico da globina α no braço curto do cromossomo 16. Os dados foram confirmados por hibridização *in situ* com sondas radioativas do gene clonado da globina em cromossomos metafásicos (Saunders-Haigh, 1980; Morton *et al.*, 1984). A aplicação da tecnologia do DNA recombinante no estudo desses genes facultou um conhecimento muito preciso da organização cromossomal do genes das globinas humanas, como demonstrado na Figura 2.

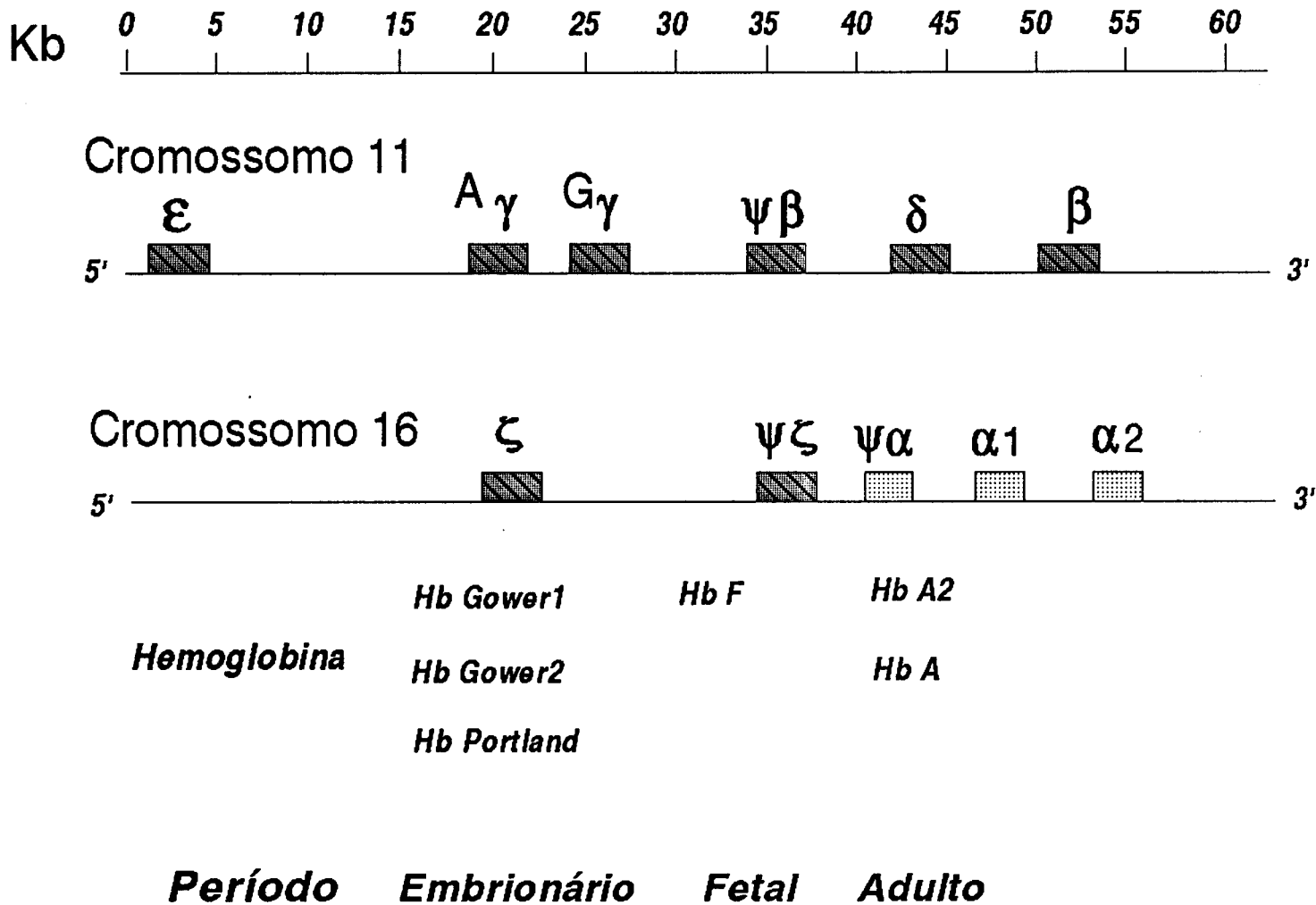


Figura 2. Organização dos genes da globina humana e hemoglobinas produzidas em cada estágio do desenvolvimento humano (Stamatoyannopoulos, 1987).

Um achado inesperado foi a presença de estruturas adicionais com grande homologia estrutural aos genes autênticos, mas que não codificavam proteínas, e que foram genericamente denominadas de pseudogenes. Outra observação interessante foi a disposição dos genes no cromossomo segundo a mesma ordem em que são ativados no decorrer do desenvolvimento ontogenético normal. O significado desta organização em relação ao controle da expressão gênica ainda não está completamente esclarecido (Lawn *et al.*, 1978; Fritsch *et al.*, 1980; Lauer *et al.*, 1980).

A principal hemoglobina sintetizada no período embrionário é representada por um tetrâmero de duas cadeias ζ e duas cadeias ϵ , denominada hemoglobina Gower1. Rapidamente, entretanto, a produção destas duas cadeias de globina diminui e o gene da globina α é ativado com conseqüente produção de cadeias α . Existem, na verdade, dois genes α , $\alpha 2$ e $\alpha 1$, que apresentam grande homologia e produzem a mesma proteína. Desde este período os genes α se mantêm ativos pelo restante da vida do indivíduo (Baralle *et al.*, 1980).

O grupo de genes relacionados à globina β , contém uma série adicional que inclui os genes γ e δ . Os primeiros consistem de um par de genes, G_γ e A_γ , que diferem na codificação de somente um aminoácido, Glicina para G_γ e Alanina para A_γ , na posição 136. Os genes γ , inativos durante o período embrionário, são ativados durante a vida fetal e representam o principal produto deste grupo gênico nesse período. Pouco antes e após o nascimento, tem início um processo extremamente sincronizado de substituição da produção dos genes γ para a produção do gene β , de tal forma que, durante todo o tempo, a somatória da produção dos dois genes permanece aproximadamente constante (Efstratiadis *et al.*, 1980; Lawn *et al.*, 1980; Spritz *et al.*, 1980; Shen *et al.*, 1981).

O aparecimento dos genes γ durante o programa de desenvolvimento fetal parece ser um evento evolucionário relativamente recente, pois foi detectado somente em primatas. Esta hemoglobina adicional aparentemente apresenta vantagens em relação a hemoglobina A devido ao longo período de gestação destas espécies, que requer uma liberação adequada de oxigênio para o crescimento do feto. A Hb F fetal tem maior afinidade por oxigênio que a hemoglobina de adultos, e assim é capaz de extrair, com maior

eficiência, oxigênio da circulação materna através da placenta (Slightom, 1980; Wood *et al.*, 1985).

Sinteticamente podemos relacionar que, na vida embrionária as principais hemoglobinas são: Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland ($\zeta_2\gamma_2$). Durante a vida fetal, a principal hemoglobina (Hb) é a Hb F, que inclui $\alpha_2^G\gamma_2$ e $\alpha_2^A\gamma_2$. Na vida adulta, a principal hemoglobina é a Hb A, um tetrâmero de duas cadeias α e duas cadeias β . Existe também uma outra hemoglobina denominada A₂, que é um tetrâmero de duas cadeias α e duas cadeias δ . O gene δ possui seqüências anômalas em sua região promotora, em particular na região "CCAAT box", que reduzem a eficiência da transcrição gênica. Em parte por esta razão, a quantidade de RNAm do gene δ e correspondentemente da globina δ é consideravelmente menor que a de RNAm do gene β (Weatherall *et al.*, 1989).

Com relação às distâncias intergenes pode ser observado um padrão geral onde pares, que resultaram de eventos de duplicação relativamente recentes, estão próximos (dois loci α ; δ e β ; G_γ e A_γ). Distâncias maiores separam os genes que se expressam em diferentes épocas do desenvolvimento e são evolutivamente menos relacionados. Assim os genes δ e β estão separados por aproximadamente 5 a 6 kilobases (Kb), já o par δ/β está a cerca de 15 a 18 Kb distante de G_γ/A_γ . No gene α , em média, 4 Kb separam os dois genes α funcionais α_1 e α_2 , e mais de 20 Kb separam ζ e α (Bunn & Forget, 1986).

A região codificadora dos genes da globina humana, como ocorre na maioria dos genes de organismos eucarióticos, é interrompida em duas posições, por "introns" (IVS - "Intervening Sequence"), os quais separam esta região em três "exons". Nos genes não- α , as seqüências são interrompidas entre os "codons" 30 e 31 e entre os "codons" 104 e 105. No grupo da globina α as seqüências interrompem-se entre os "codons" 31 e 32 e 99 e 100 (Figura 3) (Tilghman *et al.*, 1978; William *et al.*, 1990).

5' → 3'

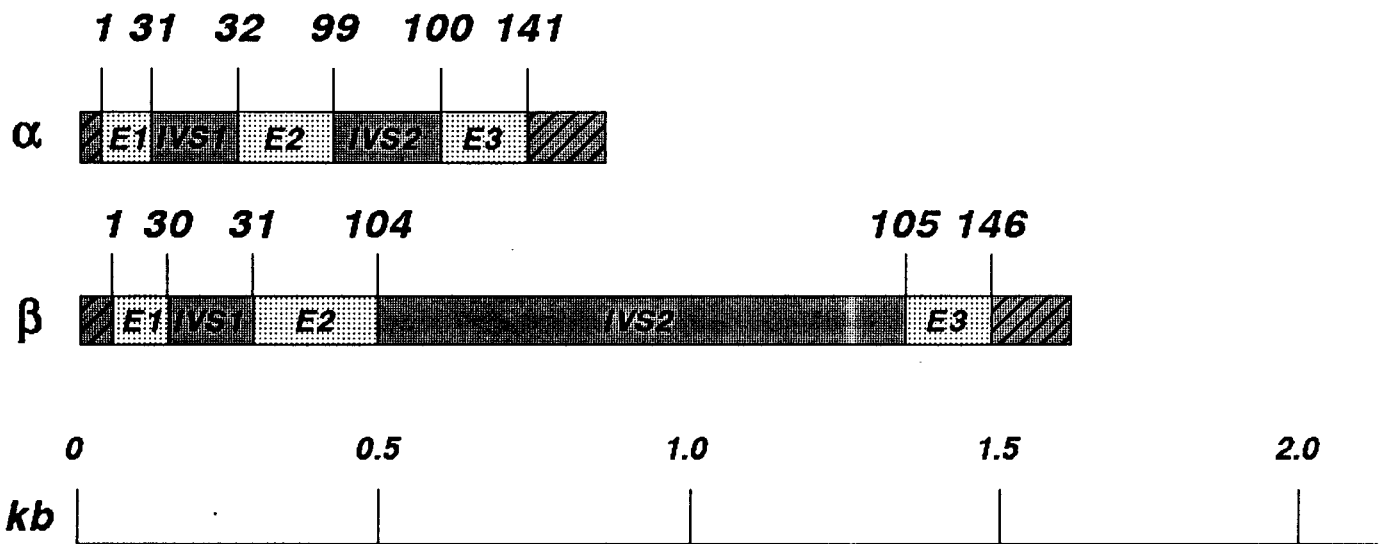


Figura 3. Genes das globinas α e β (IVS - "intron"; E - "exon") (William *et al.*, 1990).

Hemoglobinas Humanas Variantes

Atualmente existem mais de 600 hemoglobinas humanas variantes conhecidas (Wajcman *et al.*, 1991). A Tabela I apresenta uma visão de grande parte dessas variantes, de estrutura conhecida, de acordo com suas características gerais.

Tabela I. Quadro geral das variantes estruturais de hemoglobina.

Cadeia	Total	Instável	Afinidade O ₂ anormal	Sem manifestação clínica
α	126	16	6	102
β	232	68	36	122
γ	38	1		
δ	15			
fusão	9			

Em 1948, Horlein e Weber reportaram a primeira hemoglobinopatia. Eles estudaram uma família com cianose congênita e demonstraram que os membros afetados da família tinham hemoglobina com propriedades espectrais anormais (Bunn & Forget, 1986).

No início dos anos 50 a anemia falciforme, no trabalho clássico de Pauling, foi identificada como secundária a uma hemoglobina eletroforeticamente anormal. Posteriormente, foi demonstrado que a Hb S se devia à existência de uma única substituição de aminoácido na cadeia β ($\beta 6$ Glu-Val). Em seguida à identificação da Hb S, foram caracterizadas as Hbs C, D, e E (Weatherall & Clegg, 1981). Com a descoberta de grande número de novas variantes foi necessária a adoção de nomes específicos para cada uma delas. Termos estranhos e provocativos começaram a surgir na literatura, alguns exóticos

(Hb Aida) (Ramot *et al.*, 1972), outros paroquiais (Hb Riverdale-Bronx) (Ranney *et al.*, 1968), ou ainda patrióticos (Hb Abraham Lincoln) (Honig *et al.*, 1973).

A maioria das variantes descritas foi detectada por comportamento eletroforético anormal. O método inicial na investigação de hemoglobinas anômalas inclui, em geral, a eletroforese em acetato de celulose ou gel em pH alcalino (8.3 a 8.8). Entre as aproximadamente 200 variantes sem manifestações clínicas, 95% apresentam substituição de um aminoácido que acarreta mudança de carga elétrica na proteína. Por outro lado, uma significativa proporção (45%) de variantes com manifestações clínicas graves, apresentam substituições que não alteram a carga elétrica protéica (Moo-Penn *et al.*, 1980). Outras técnicas complementares e de uso obrigatório incluem eletroforese em agar citrato pH 6,0 a 6,5 e solubilidade em tampão fosfato concentrado (Schneider & Barwick, 1982; Winter & Yodh, 1983). Pode-se ainda realizar eletroforese em acetato de celulose (pH 8,6) e agar citrato (pH 6,0 a 6,5), juntamente com eletroforese de cadeias de globina em uréia 6M ou eletroforese de alta resolução, como a focalização isoelétrica (Basset *et al.*, 1978; Galacteros *et al.*, 1980) e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (Strahler *et al.*, 1983), as quais têm também provado serem úteis no isolamento de variantes que escapam à detecção por outros métodos. Estes métodos em conjunto são capazes de identificar, sem dúvidas, as variantes mais comuns, como Hb S e Hb C. No entanto, para caracterização de hemoglobinas anômalas menos freqüentes é essencial a digestão da cadeia de globinas, separação dos fragmentos por HPLC ou eletroforese/cromatografia ("fingerprinting") seguido de análise de aminoácidos.

Publicações atuais a respeito de hemoglobinas anormais incluem medidas de estabilidade e oxigenação, mesmo quando nenhuma anormalidade clínica ou hematológica se encontra associada, fornecendo assim dados globais dessas variantes, incluindo um espectro que abrange desde aquelas com propriedades próximas do normal até aquelas que produzem manifestação clínicas como hemólise ou eritrocitose.

Bases Genéticas das Variantes de Hemoglobina

As variantes de hemoglobinas são caracterizadas pela anormalidade estrutural de uma subunidade particular da globina. Apresentam herança codominante, de acordo com a genética mendeliana clássica. Se os pais são heterozigotos para a variante Hb S (AS), existe 50% de chance da criança ser AS, 25% AA e 25% SS. Se um pai é heterozigoto para Hb S (AS) e o outro heterozigoto para Hb C (AC), há 25% de chance que a criança apresente o estado de heterozigose dupla (SC), seus eritrócitos irão conter 50% de Hb S e 50% de Hb C e nenhuma Hb A. O gene para Hb S resulta em manifestação clínica somente se herdado em estado homozigoto (SS) ou em heterozigose dupla (SC, SD Los Angeles, SO Arab, ou talassemia β^S). Em alguns casos de hemoglobinas anormais sua função está significativamente alterada e o estado homozigoto é incompatível com a vida (Bunn & Forget, 1986).

Pelo fato das cadeias da globina β serem codificadas por dois genes, as hemoglobinas anormais derivadas de mutações dessa cadeia de globina, e funcionalmente anormais, constituem metade do total de hemoglobina nas hemácias. Desse modo, essas variantes contribuem significativamente para o funcionamento destas hemácias. Em contraste, as cadeias α são codificadas por 4 genes. Portanto, variantes de cadeia α geralmente constituem somente 25% do total de hemoglobina, não causando alteração significativa na função celular. Esta consideração explica porque 50% das variantes de cadeia β são associadas a manifestações clínicas, ao passo que apenas 20% de variantes de cadeia α foram identificadas até hoje (Weatherall & Clegg, 1981).

Um total de 2583 substituições de uma única base nitrogenada do DNA são teoricamente possíveis envolvendo os 141 resíduos da cadeia α e 146 resíduos de cadeia β . Destas, 1690 poderiam resultar em alteração do aminoácido, mas somente 1/3 ou 575 poderiam causar mudança na carga elétrica detectável por eletroforese de rotina (Sick *et al.*, 1967).

A maioria das alterações da seqüência dos nucleotídeos em "exons" e que não resultam em variabilidade na seqüência de aminoácidos apresentam alteração na terceira posição de um determinado "codon". Por outro lado, substituições de bases na primeira ou

segunda posição do "codon" podem resultar em cadeia globínica anômala (Bunn & Forget, 1986).

Se um indivíduo é heterozigoto para uma variante da cadeia β com alteração em carga elétrica, a eletroforese irá geralmente revelar dois componentes principais, Hb A ($\alpha_2\beta A_2$) e Hb X ($\alpha_2\beta X_2$). Contudo, esta análise dá impressão errônea da distribuição de hemoglobina nas hemácias. Na verdade, a hemoglobina predominante dentro da célula é um tetrâmero híbrido $\alpha_2\beta A\beta X$. Quando analisados por eletroforese ou cromatografia, estas hemoglobinas híbridas não são detectadas, porque elas se dissociam em dímeros de carga diferente que se separam durante a análise (Bunn & Forget, 1986).

Algumas Hemoglobinas Variantes

Hb S: A Hb S foi a primeira hemoglobina anormal a ser detectada, e representa a mais importante e freqüente das variantes estruturais da Hb A. É devida a uma mudança em um dos 146 aminoácidos no gene da globina β : uma substituição de Ácido Glutâmico por Valina no 6º "codon". Esta mutação de ponto, que pode ser abreviada como $\beta 6$ (A3) Glu-Val, resulta da mudança de um único nucleotídeo (A-T) (Serjeant, 1992). Em homozigose esta mutação causa a anemia falciforme, uma séria anomalia, relativamente comum em algumas partes do mundo. Prevalece na raça negra e tem uma distribuição geográfica determinada, ocorrendo mais freqüentemente na África equatorial e menos comumente na área do Mediterrâneo, principalmente Grécia, Itália e Israel, assim como na Índia, Arábia Saudita e em países que receberam imigrantes destas regiões. Cerca de 8% dos negros norte-americanos são portadores do gene para Hb S, e prevalência semelhante foi estimada em nosso país (WHO, 1966). A anormalidade da Hb S foi identificada em 1949, por Pauling e colaboradores.

A relativa insolubilidade da desoxihemoglobina S é a base física do fenômeno de falcização, do qual decorrem as múltiplas manifestações orgânicas da anemia falciforme. Sob baixa tensão de oxigênio as moléculas de Hb S, em concentração elevada, tornam-se relativamente insolúveis e se agregam em longos polímeros ou fibras que alteram a forma do eritrócito. Nesses polímeros os tetrâmeros se dispõem ao redor de um eixo vertical

originando, em cortes transversais, anéis de moléculas de hemoglobina empilhados uns sobre os outros. A formação destes polímeros deforma o eritrócito originando as clássicas formas de hemácias falciformes (Dean & Schechter, 1978).

Por outro lado, em consequência de sua peculiar alteração estrutural, a HbS produz, além da anemia hemolítica, o comprometimento de numerosos tecidos e órgãos. O quadro clínico se caracteriza por episódios agudos, habitualmente agrupados em vaso-oclusivos, hemolíticos, aplásticos e síndrome de seqüestração, no seu conjunto denominados crises de falcização. As crises vaso-oclusivas, tanto por sua freqüência incomparavelmente maior, como pelas repercussões orgânicas globais que acarretam, figuram como manifestação clínica fundamental nos pacientes eritro-falcêmicos (Finch, 1972; Konotey-Ahulu, 1974). Fatores desencadeadores como infecções, desidratação, febre ou outros muitas vezes não detectados, são capazes de provocar uma redução abrupta na plasticidade dos eritrócitos que bloqueiam a circulação a nível capilar. O impedimento do fluxo, permitindo remoção do oxigênio dos eritrócitos discóides estagnados, que também falcizam, desencadeia fenômenos embólicos e trombozes, que representam o substrato morfológico das crises vaso-oclusivas (Konotey-Ahulu, 1974; Milner, 1974; Dean & Schechter, 1978; Bunn & Forget, 1986).

Hb C: A hemoglobina C ($\alpha_2\beta_6$ (A3) Glu - Lys) foi a segunda variante a ser identificada eletroforeticamente (Itano, 1950) e estruturalmente (Hunt & Ingram, 1960). É comum em indivíduos de ascendência Africana. São conhecidos 4 diferentes genótipos para esta variante: heterozigotos AC que apresentam um percentual de hemoglobina anômala que varia de 25% a 40% da hemoglobina total; homozigotos CC; duplo heterozigotos Hb C/ β -talassemia e duplo heterozigotos SC. Devido ao fato de ser relativamente benigna, a prevalência da doença SC é muito próxima da sua incidência ao nascimento. Indivíduos SC têm geralmente anemia hemolítica moderada, apresentam crescimento e desenvolvimento normais e somente uma modesta diminuição da longevidade. Cerca de 65% dos pacientes apresentam esplenomegalia moderada, que normalmente não contribui para o grau de anemia (Bunn *et al.*, 1982). O diagnóstico da doença SC é estabelecido por eletroforese de hemoglobina, que revela aproximadamente

50% de Hb S e o restante demonstra mobilidade diminuída, característica da Hb C. A Hb F raramente excede 2% do total de hemoglobina (Weatherall *et al.*, 1989).

Hb D-Punjab: A Hb D ($\alpha\beta$ 121 (GH4) Glu-Gln) (também conhecida como Hb D-Punjab, Hb D-Los Angeles, Hb North Carolina, Hb Chicago, Hb D-Portugal ou Hb Oak Ridge) é uma hemoglobina variante encontrada no Paquistão e noroeste da Índia, particularmente na região de Punjab (Brittenham, 1987). Dentre os Sikhs, da região de Punjab, 2 a 3% são heterozigotos para Hb D-Los Angeles, que ocasionalmente também tem sido observada em outros grupos étnicos (Zago & Costa, 1988). Estes indivíduos têm valores de hemoglobinas normais, sem evidência de hemólise, eritrócitos normais e fragilidade osmótica diminuída. Esta hemoglobina tem estabilidade normal e afinidade pelo oxigênio ligeiramente aumentada (Zeng *et al.*, 1989).

A Hb D-Punjab não é comum no Brasil, mas foi descrita tanto em heterozigose, quanto em associação com Hb S e talassemia β . Os heterozigotos simples e homozigotos são assintomáticos, já as associações são caracterizadas por moderada anemia hemolítica (Zago & Costa, 1985, 1988). A associação Hb S/Hb D-Punjab é clínica e hematologicamente indistinguível da homozigose para Hb S. A Hb D migra como a Hb S sob condições de eletroforese em acetato de celulose, mas a suspeita da sua presença pode ser feita pela mobilidade eletroforética em gel de agar e na sua elevada solubilidade em tampão fosfato. Entretanto, a identificação definitiva desta variante somente pode ser feita por análise estrutural da proteína ou por análise do DNA (Bunn & Forget, 1986).

Hb Lepore: A hemoglobina Lepore foi descrita pela primeira vez em 1958, por Gerald e Diamond, em indivíduos de origem italiana, como uma hemoglobina de mobilidade reduzida em relação a Hb A. A análise estrutural dessa hemoglobina revelou uma cadeia híbrida que consistia da metade N-terminal de uma cadeia δ fundida com a metade C-terminal de cadeia β , produto de um gene híbrido $\delta\beta$. O nome Hb Lepore foi derivado do nome do primeiro paciente estudado. Essa variante surgiu de um processo de pareamento desigual durante a meiose, que acontece devido ao fato dos dois genes serem

altamente homólogos (diferindo somente em 10 dos seus 146 aminoácidos) e contíguos no cromossomo 11. Os genes mutantes resultam da fusão da extremidade 5' do gene δ e da extremidade 3' do gene β , produzindo uma deficiência de 7,4 kilobases na região $\delta\beta$ (Flavell *et al.*, 1978) (Figura 4).

A ritmo de síntese da cadeia $\delta\beta$ da Hb Lepore é intermediária entre aquela das cadeias δ e β , e parece ser virtualmente confinada à medula óssea (Gill *et al.*, 1972). O comportamento de síntese da cadeia híbrida parece ser influenciado pela instabilidade do RNAm ou pela sua capacidade funcional, devido a características estruturais específicas das extremidades não codificadoras 5' ou 3' (Bank, 1978).

Posteriormente foram descobertos 3 tipos de Hb Lepore estruturalmente distintos, que diferem no ponto onde ocorreu a quebra durante o "crossing-over": Hb-Lepore-Boston ($\delta 87(\text{Gln}) \beta 116(\text{His})$) (Baglioni, 1962, 1965; Labie *et al.*, 1966), Hb-Lepore-Baltimore ($\delta 50(\text{Ser}) \beta 86(\text{Ala})$) (Ostertag & Smith, 1969) e Hb-Lepore-Hollandia ($\delta 22(\text{Ala}) \beta 50(\text{Thr})$) (Barnabas & Muller, 1962) (Figura 5).

A hemoglobina Lepore Boston (sinônimos: Hb Lepore Washington, Pylos, Cyprus, The Bronx, Augusta) é de longe a mais freqüentemente observada em diferentes populações do mundo (Camaschella *et al.*, 1989; Fioretti *et al.*, 1992). A hemoglobina Lepore Baltimore, mais rara, somente foi observada em uma família Afro-americana em Baltimore (Ostertag & Smith, 1969), uma família na Iugoslávia (Efremov *et al.*, 1976), uma família do norte da Sardenha (Masala *et al.*, 1990) e algumas famílias na Espanha (Marinucci *et al.*, 1979; Lanclos *et al.*, 1987; Mavilio *et al.*, 1983; Efremov *et al.*, 1988).

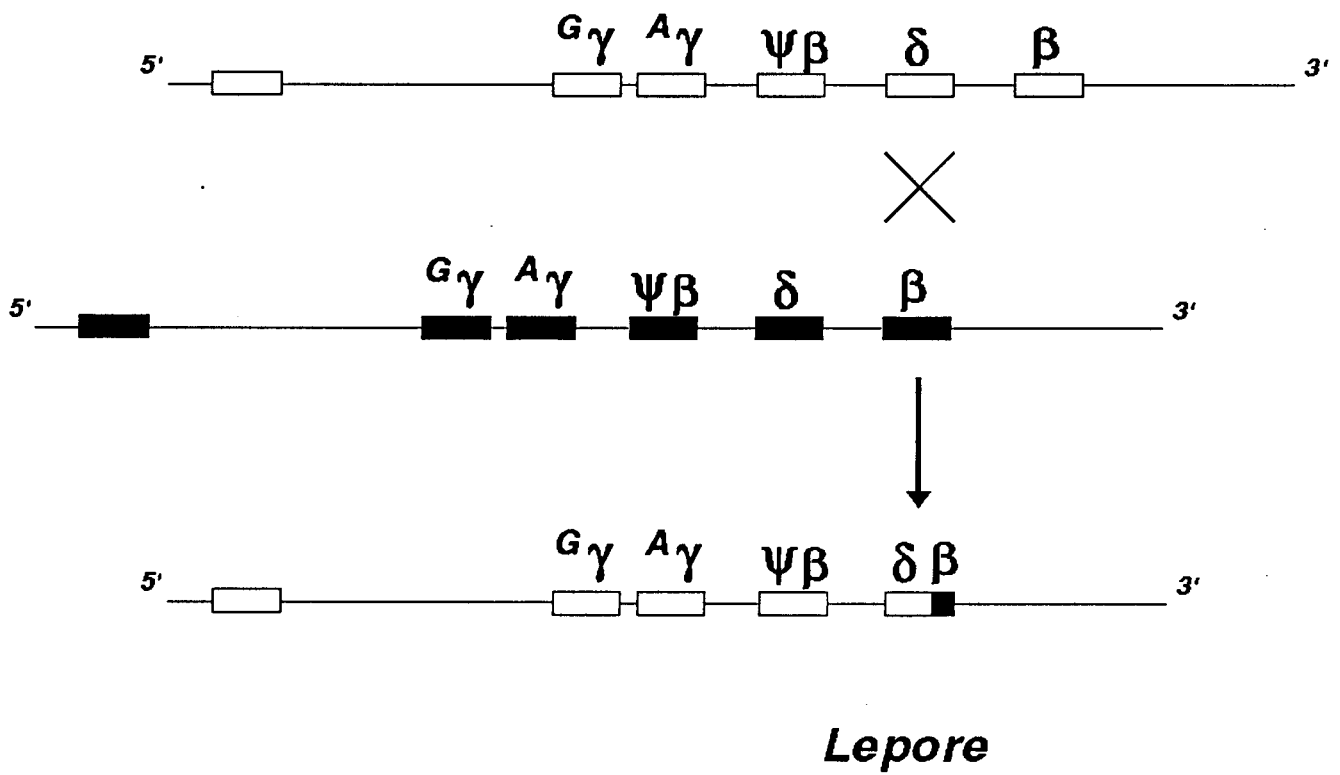


Figura 4. Representação esquemática do pareamento cromossômico que origina a Hemoglobina Lepore.

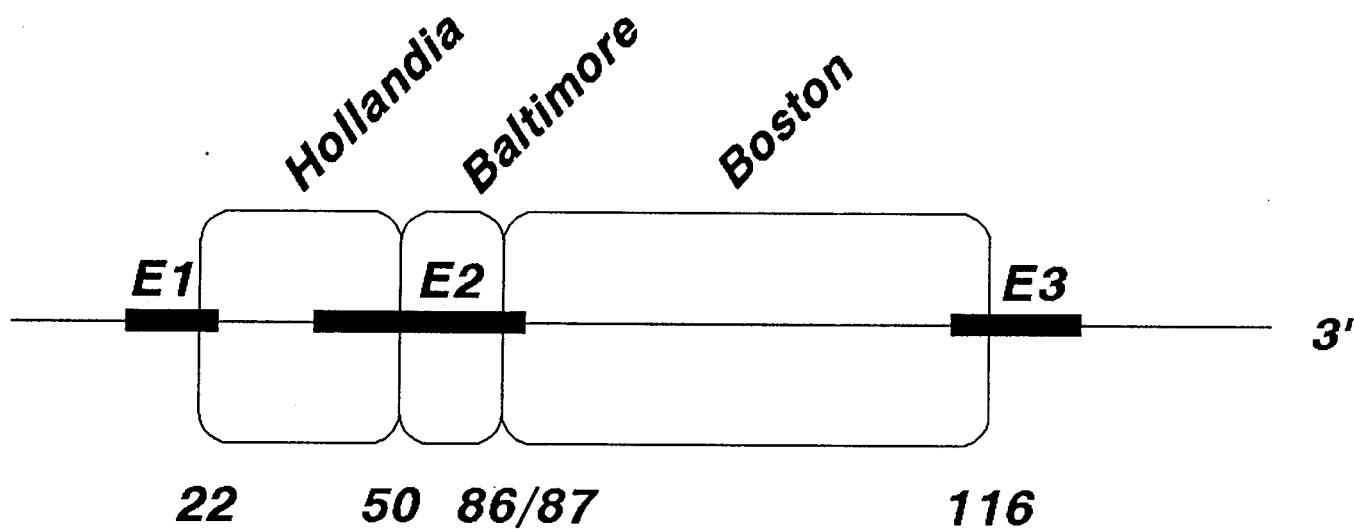


Figura 5. Representação esquemática das regiões que compreendem o ponto de quebra, nos genes das cadeias δ e β , no evento de recombinação para os três diferentes tipos de Hemoglobina Lepore (E = "exon").

Hemoglobinas Instáveis:

A maioria das variantes de hemoglobinas não é associada a manifestações clínicas detectáveis. Entretanto, é conhecido um grande número de variantes que apresentam uma notável propensão à desnaturação. Como resultado, a hemoglobina anormal tende a se agregar dentro da hemácia, formando uma massa amorfa, conhecida como corpúsculo de Heinz e, em última análise causando hemólise (Zinkham *et al.*, 1980).

O termo "hemoglobina instável" é reservado àquelas variantes cuja instabilidade é suficiente para causar hemólise clinicamente reconhecível. Outras variantes, como Hb E e H, podem apresentar instabilidade *in vitro*, mas não estão associadas a qualquer evidência de hemólise (Bunn & Forget, 1986). Flutuação dos dados clínicos e laboratoriais no curso de um dado caso é uma forte característica de uma Hb instável. A maioria das Hb instáveis ocorre com frequência baixa nas populações (Ohba, 1990).

Hb instáveis são transmitidas como caracteres autossômicos dominantes. Entretanto, casos graves são geralmente resultado de mutações *de novo*, e provavelmente, devido a severidade de hemólise, são incompatíveis com vida reprodutiva. Em casos moderados, a doença hemolítica congênita pode não ser percebida por muitos anos. Os pacientes procuram cuidados médicos devido a episódios febris, sendo então detectada a hemólise grave (Stamatoyanuopoulos, 1987).

São conhecidas mais de 90 diferentes variantes instáveis. Algumas, como a Hb Köln, foram encontradas repetidamente em famílias não relacionadas distribuídas por todo o mundo. A Hb Köln ($\alpha_2\beta$ 98) caracteriza-se pela substituição de uma Valina por uma Metionina na posição (FG5) da cadeia da globina β (Carrell *et al.*, 1966). Esta substituição resulta em alteração no contato entre as subunidades protéicas. Análise de aminoácidos demonstra a presença de quantidades iguais de cadeias α e β . Esta variante tem uma tendência a dissociação em dímeros, provavelmente relacionada com perda do grupo heme das cadeias β . Medidas de equilíbrio de oxigênio apontam que essa hemoglobina possui alta afinidade por oxigênio.

A hemoglobina Zürich ($\alpha_2\beta$ 63 (His - Arg)) foi a primeira variante instável a ser analisada estruturalmente. Sua descrição data de 1960, em uma garota que apresentou

anemia hemolítica após ingestão de sulfonamida (Ohba, 1990). Apresenta, no "codon" 63 do gene da globina β , uma alteração de bases que resulta na substituição do resíduo Histidina por Arginina (posição E7). Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a Hb Zürich é sintetizada em taxa similar à Hb A, embora sua concentração no sangue seja menor que a metade da Hb A (Rieder *et al.*, 1965). A alteração estrutural nesta variante conduz a conseqüências funcionais e clínicas particularmente interessantes (Muller & Kingma, 1961; Zinkham *et al.*, 1980; Bunn & Forget, 1986). A Arginina, positivamente carregada, provoca fácil acesso de sulfalamida ao ferro do grupo heme. Isto explica a propensão dos indivíduos com esta variante a terem episódios hemolíticos após ingestão de derivados de sulfa. Fenazopiridina também causa desnaturação da Hb Zürich *in vitro* e hemólise *in vivo*. Ambos os efeitos podem ser revertidos através de aumento dos níveis de carboxihemoglobina. O monóxido de carbono se liga mais fortemente ao ferro de heme da Hb Zürich do que da Hb A, uma vez que a Histidina da Hb A torna a ligação mais fraca. O CO protege a Hb Zürich da desnaturação oxidante. Um estranho paradoxo pode ser observado neste caso: fumantes portadores de Hb Zürich acumulam altos níveis de carboxihemoglobina e têm, portanto, menos hemólise que afetados não fumantes (Zinkham *et al.*, 1980; Virshup *et al.*, 1983).

Durante a desnaturação formam-se intermediários caracterizados por absorção específica em espectro visível. A variante Zürich, assim como a Köln, demonstra um rápido decréscimo na razão de absorção a 540nm e 280nm durante a incubação do hemolisado a 50°C, certamente devido à formação de intermediários com o grupo heme posicionado de forma diferente da normal (hemicromos) (Ohba, 1990).

Portadores de Hb Zürich são assintomáticos, apresentam hematócrito normal, algumas vezes reticulocitose moderada e hemólise ausente ou mínima, a menos que haja exposição a agentes oxidantes. O reconhecimento clínico depende freqüentemente da ocorrência de anemia e icterícia durante infecções ou após administração de sulfonamidas. Alguns dias de tratamento com sulfa podem resultar em crise hemolítica, surgimento de corpúsculos de Heinz e hiperbilirrubinemia. A anemia é revertida rapidamente com a suspensão da droga (Bunn & Forget, 1986).

Uma revisão clínica feita por Zinkham e colaboradores (1980 e 1983) durante 20 anos demonstrou uma variação na expressão fenotípica desta condição observada por diferentes concentrações de haptoglobina e hemopexina, desnaturação térmica mais ou menos pronunciada e indivíduos onde não se podia observar anemia após exposição a sulfonamidas.

O diagnóstico de Hb instável é confirmado pelos testes de instabilidade térmica, teste de precipitação pelo isopropanol e pela presença de uma hemoglobina com migração eletroforética anormal. Entretanto, só 45% apresentam substituições que envolvem mudança de carga, e ainda assim, algumas são de difícil detecção pela eletroforese. Desta forma, em muitos casos é igualmente difícil a purificação de uma Hb instável por procedimentos rotineiramente aplicados para hemoglobinas não instáveis. Por esta razão, muitas vezes é necessário tirar vantagens da relativa insolubilidade ou desnaturação aumentada, no sentido de se purificar e estudar suas propriedades a partir da recuperação da hemoglobina insolúvel (Ohba, 1990).

A caracterização e interpretação estereoquímica das hemoglobinas instáveis se amplia à medida que novos casos são encontrados. O estabelecimento de técnicas de sequenciamento de DNA genômico tem permitido a detecção de genes anormais, os quais dificilmente seriam detectados através de análise proteica.

Síndromes Talassêmicas

As síndromes talassêmicas compreendem um grupo heterogêneo de alterações da síntese das cadeias de globina, nas quais a mutação suprime total ou parcialmente o nível de síntese da cadeia α ou da cadeia β . Esta redução na síntese de uma das cadeias conduz a uma anomalia na relação entre a produção das duas cadeias (α/β) que normalmente é próxima da unidade. Esse mecanismo representa o aspecto fisiopatológico básico nas síndromes talassêmicas (Weatherall, 1981). A cadeia que é produzida em taxa normal está em relativo excesso. Na ausência de uma cadeia complementar com a qual forma um tetrâmero, o excesso de cadeia normal é instável e forma agregados que precipitam no interior do citoplasma celular, lesam a membrana e resultam na destruição prematura do eritrócito (eritropoese ineficaz) ou hemólise. Em adição, o defeito da síntese da hemoglobina produz anemia hipocrômica e microcítica (Bank, 1978).

As síndromes talassêmicas podem ser classificadas em 2 grupos principais: as talassemias α , onde a síntese da cadeia α está reduzida ou ausente, e as talassemias β , nas quais a síntese da cadeia β está comprometida.

Talassemia β

As síndromes talassêmicas β foram introduzidas no Brasil principalmente através da intensa atividade imigratória de italianos, ocorrida após a segunda metade do século XIX (Ramalho *et al.*, 1985). Na população caucasóide paulista, a frequência de heterozigotos da talassemia β foi estimada em 1% (Ramalho, 1976; Zago *et al.*, 1981). Já entre paulistas descendentes não miscigenados de italianos essa frequência aumenta para cerca de 6,4% (Ramalho, 1976).

O decréscimo na produção da globina β causa anemia hipocrômica, microcítica e, o desequilíbrio na síntese da globina leva à precipitação do excesso de cadeias α , danificando a membrana. Em contraste com a globina α , entretanto, a cadeia β só é

importante no período pós-natal. Conseqüentemente, o surgimento da talassemia β só ocorre alguns meses após o nascimento, quando a globina β normalmente substitui a globina γ (Forget, 1979).

Em contraste com as talassemias α que são devidas, em sua maioria, a deleções, as talassemias β são geralmente decorrentes de substituições em um único par de bases. Quando os alelos da talassemia β resultam em supressão da produção de globina β , de forma que nenhuma Hb A está presente, a condição é designada talassemia β^0 . Se alguma Hb A é detectável, o paciente apresenta talassemia β^+ (Weatherall & Clegg, 1981).

Indivíduos com dois alelos de talassemia β (homozigotos) têm talassemia maior ou anemia de Cooley, uma condição caracterizada por grave anemia hemolítica, dependente de transfusões regulares e intenso acompanhamento médico. Crianças afetadas por talassemia β em homozigose apresentam anemia, geralmente antes de 2 anos de idade, uma vez que a produção pós-natal de Hb F diminui. A severa anemia hemolítica observada nestes pacientes conduz a um quadro de alterações no crescimento e desenvolvimento, alterações ósseas típicas, icterícia, hepatoesplenomegalia, e uma expansão da medula óssea. Os eritrócitos no sangue periférico são todos marcadamente hipocrômicos e variam em forma e tamanho. O tratamento das talassemias é atualmente baseado na correção da anemia e expansão da medula óssea, por transfusão sangüínea, e no controle do conseqüente acúmulo de ferro, pela administração de agentes quelantes. Entretanto, transplante de medula óssea, para pacientes em curso inicial da doença, figura como medida promissora (Bank, 1978).

Portadores de um alelo de talassemia β em geral não apresentam manifestações clínicas relevantes e são designados como possuidores de "talassemia menor". Tais indivíduos têm eritrócitos hipocrômicos e microcíticos, podendo apresentar leve anemia, muitas vezes confundida com deficiência de ferro. O diagnóstico da talassemia menor pode ser feito através de eletroforese de hemoglobina, que geralmente revela um nível aumentado de Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) (Ramalho *et al.*, 1985).

Entre os limites extremos, ocorrem formas caracterizadas por quadros moderadamente graves designados por "talassemia intermediária". Geralmente são

indivíduos significativamente anêmicos e sintomáticos, mas que não requerem transfusão sangüínea (Weatherall & Clegg, 1981).

Atualmente são conhecidas cerca de 135 mutações que conduzem à talassemia β com manifestação clínica significativa (Kazazian, 1990).

A Figura 6 aponta algumas das mutações da talassemia β . Estas mutações encontram-se distribuídas por todo o gene.

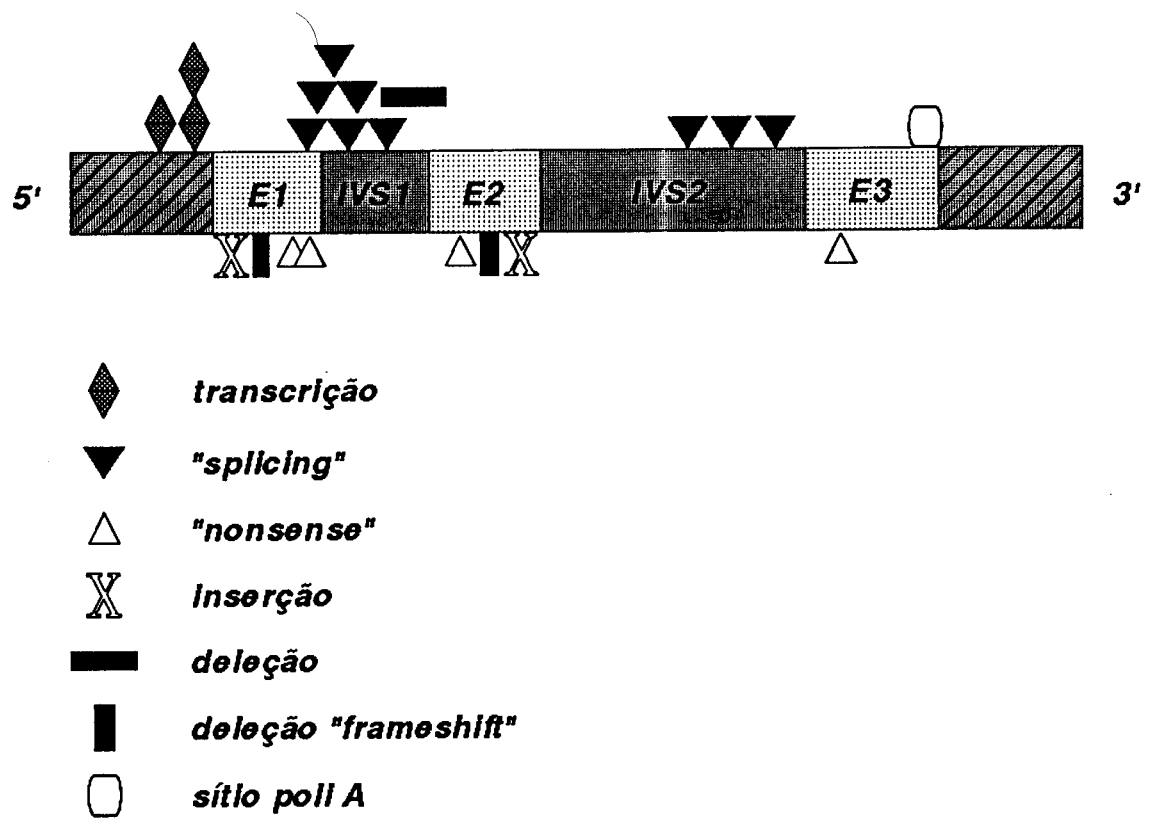


Figura 6. Exemplos de mutações que originam a talassemia β (IVS." íntron"; e."exon").

Uma categoria interessante inclui indivíduos com mutações de ponto na região promotora, inicialmente descritas como características do gene da globina β . Tais indivíduos apresentam uma redução de 10% na produção referente ao gene mutante (Dierks *et al.*, 1983). Mutações que conduzem a terminação da síntese de cadeia globínica devido à interrupção prematura na tradução podem ser definidas pela presença de um "codon" âmbar (mutações "nonsense") ou alteração na fase de leitura (mutações "frameshift"). Estas mutações usualmente geram um produto muito instável, rapidamente degradado na célula (Huisman, 1990; Novelletto *et al.*, 1990).

Outras anormalidades decorrem de mutações nos sinais de clivagem ("splicing"). Estas seqüências são imprescindíveis para o processamento normal do RNA e assim, mutações nestas regiões podem produzir talassemia β^0 , como no caso da mutação no "intron" 1, posição 1 (IVS1-1). Por outro lado, mutações nas posições 5 e 6 do "intron" 1 reduzem a eficiência do mecanismo normal de clivagem, mas ainda resultam na produção de quantidades detectáveis de globina β normal. A mutação no "intron" 1, posição 110 (IVS1-110), cria uma seqüência alternativa de clivagem ("Cryptic site"), de forma que 90% dos eventos de clivagem usam o novo sítio e só 10% usam o local correto (Huisman, 1990).

Outros exemplos de mutação incluem aqueles que afetam o sinal de poliadenilação, onde AATAAAA é convertido em AACAAAA. A transcrição ocorre normalmente, mas a clivagem e adição de resíduos de Adenina necessários para o processamento normal e transporte do RNA para o citoplasma tornam-se alteradas (Huisman, 1990; Novelletto *et al.*, 1990).

Estudos anteriores em nosso laboratório, com o emprego de hibridização com oligonucleotídeos alelo específicos, mostram que na população estudada a maioria das mutações é representada por aqueles originários da região Mediterrânea. Além disso, foi possível evidenciar que quatro mutações, a mutação âmbar no "codon" 39 (CD39), a IVS1-110, a IVS1-6 e a IVS1-1 perfazem cerca de 95% das mutações detectadas. No entanto, vários pacientes cujas alterações moleculares não foram detectadas pelo método acima permaneceram ainda sem esclarecimento diagnóstico a nível molecular (Martins, 1993).

Em razão do crescente número de variantes estruturais raras de hemoglobinas em análise em nosso laboratório e o previsível aumento no número de pacientes com talassemia β em que as mutações mais freqüentes haviam sido afastadas e portanto, necessitavam de esclarecimento da alteração molecular, os objetivos deste trabalho foram:

1. Padronizar o método de sequenciamento direto de fragmentos do gene da globina β amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR).
2. Estabelecer um método de sequenciamento a partir de RNA mensageiro extraído de reticulócitos do sangue periférico, visando simplificar e tornar mais rápida a identificação de variantes estruturais.
3. Aplicar os métodos acima na identificação de hemoglobinas anômalas e ainda sem identificação a nível molecular. Adicionalmente, utilizar estes métodos na identificação de algumas mutações previamente selecionadas da talassemia β .

CASUÍSTICA

Os casos clínicos incluem pacientes em acompanhamento regular nos Ambulatórios de Hematologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP e da Escola Paulista de Medicina. Algumas hemoglobinas anômalas foram detectadas em doadores de sangue ou em triagem pré-natal. Os dados clínicos resumidos dos pacientes analisados estão relatados a seguir:

1. Paciente com 10 anos de idade, sexo feminino, cor negra, quadro clínico típico de doença falciforme.
2. Paciente branca, sexo feminino, 38 anos de idade, dois episódios de anemia hemolítica, aparentemente após receber antibióticos. No exame físico apresentava icterícia e esplenomegalia moderada. Um sobrinho da paciente referia um episódio de hemólise aguda após ingestão de grande quantidade de salsichas.
3. Paciente branca, sexo feminino, 4 anos de idade, icterica desde o nascimento. Pai esplenectomizado há 20 anos e tia com esplenomegalia.
4. Paciente branca, sexo feminino, 24 anos de idade, não apresentava manifestações clínicas relevantes. A anormalidade na hemoglobina foi detectada em teste pré-natal de rotina.
5. As pacientes eram duas irmãs, de 10 e 12 anos de idade, descendência italiana, que foram investigadas devido à observação de microcitose e hipocromia em análise de sangue periférico de rotina.

6. Paciente previamente identificado como portador das variantes Hb Porto Alegre e Hb Santa Ana.

7. Paciente heterozigoto para talassemia β . Estudo anterior mostrou que a alteração molecular era a mutação âmbar no "codon" 39 (Martins, 1993).

8. Paciente heterozigoto para talassemia β . Estudo anterior mostrou que a alteração molecular era a mutação no intron 1, posição 110 (IVS1-110) (Martins, 1993).

MÉTODOS

I. Análise Hematológica:

Realizada na Seção de Hematologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

1. Hematimetria

Os valores hematimétricos foram determinados eletronicamente (Coulter Counter T8-90), imediatamente após a coleta das amostras.

2. Análise das hemoglobinas

a. Preparo dos hemolisados

As amostras de sangue (cerca de 5ml) foram coletadas em tubos plásticos, contendo EDTA 10% (sal di-sódico do ácido etileno-dinitrilotetracético) como anticoagulante, na concentração de 1,5mg/ml de sangue. Uma alíquota de cerca de 2ml deste sangue foi utilizada na preparação dos hemolisados livres de estroma. O sangue foi lavado 3 vezes com solução salina (cloreto de sódio - NaCl 0,9%), e hemolisado pela adição de 1 volume de água destilada e 0,5 volume de tetracloreto de carbono (CCl₄) para cada volume de células. Após vigorosa agitação e centrifugação a 3000rpm por 20 minutos, a camada superior foi recolhida em um tubo de ensaio, onde recebeu uma gota de cianeto de potássio (KCN) 1%. Esta camada constituía o hemolisado livre de estroma (Dacie & Lewis, 1984).

b. Determinação do padrão eletroforético

Os hemolisados foram analisados através de eletroforese em fitas de acetato de celulose, tampão Tris-EDTA-borato pH 8,9, por 50 minutos a 220 volts. As alterações hemoglobínicas verificadas em pH alcalino foram confirmadas em gel de agar 1%, tampão citrato de sódio pH 6,1, em placas de 9x12 cm, 45 mA, 4°C, corado com solução de benzidida (Wheatherall & Clegg, 1981).

c. Quantificação das hemoglobinas

A HbA₂ foi medida espectrofotometricamente após eluição das fitas de acetato de celulose. Após eletroforese de 10 μ l do hemolisado em acetato de celulose, tampão Tris-EDTA-borato pH 8,9, a banda correspondente foi recortada e a hemoglobina eluída em 3ml de tampão, enquanto as demais hemoglobinas foram eluídas juntamente, em 15ml de tampão. Após a eluição, foram medidas as absorvâncias das duas frações a 415nm e calculadas as porcentagens correspondentes à HbA₂ (Dacie & Lewis, 1984).

A Hb F foi determinada por desnaturação alcalina, que consistiu na adição de 0,2ml de hemolisado a 3,2ml de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,083N. Após 1 minuto, foram acrescentados 6,8ml de solução de sulfato de amônio saturado a 50%. Após filtração, foi determinada a absorvância do filtrado a 415nm (Dacie & Lewis, 1984)..

O teste de solubilidade para confirmação da hemoglobina S foi realizado pela medida em tampão fosfato 2.87M (Zago *et al.*, 1982).

d. Eletroforese de cadeias de globina:

20 μ l do hemolisado foram adicionados a 20 μ l de tampão (5ml de uréia 8M, 0,5ml de ácido acético glacial, 0,5ml de 2-mercaptoetanol, 2mg pironina Y) e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (3g de acrilamida, 20mg de bisacrilamida, 18,75ml de uréia 8M, 0,5ml de Triton X-100, 1,25ml de ácido acético glacial, 0,125ml TEMED [tetrametiletilenodiamina], 15mg de persulfato de amônio, 5ml de água destilada). A eletroforese foi feita por 18 horas, 6mA, à temperatura ambiente, após 2 corridas prévias: ácido acético 5%, por 1 hora a 200V e 2-mercaptoetanol, por 30 minutos a 150V. O gel foi corado com Coomassie brilliant blue 0,5% em mistura de ácido acético/metanol/água (7:30:63) por 30 minutos e descorado em mistura ácido acético/metanol/água (7:30:63) (Dacie & Lewis, 1984).

e. Teste de instabilidade térmica

O hemolisado foi preparado pela adição de 5ml de água para cada 1ml de eritrócitos e por vários ciclos de congelamento/descongelamento. A seguir, foram

adicionados 5ml de tampão Tris-HCl 0,15M pH 7,4. O estroma foi removido por centrifugação a 4000rpm por 20 minutos. 5ml do lisado foram transferidos para outro tubo, que permaneceu à temperatura de 50°C durante 60 minutos. O exame periódico do tubo no sentido de observar turbidez e floculação fina denota a presença de um precipitado, facilmente visível a olho nu, que comprova a existência de hemoglobina instável ao calor. O resultado da amostra testada foi comparado com um controle normal (Dacie & Lewis, 1984).

f. Teste de precipitação pelo isopropanol

0,2ml de hemolisado foram adicionados a 2ml de tampão isopropanol (isopropanol 17% em tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,4) pré-aquecido por 5 minutos a 37°C. A mistura foi agitada por inversão, recolocada no banho-maria e examinada após 5, 20 e 30 minutos.

O controle normal permanece claro por 30 a 40 minutos, já em presença de hemoglobina instável forma-se um precipitado nos primeiros 5 minutos, tornando a amostra floculada durante 20 minutos (Dacie & Lewis, 1984).

II. Análise Molecular

1. Extração de DNA de alto peso molecular:

A extração de DNA genômico de leucócitos foi feita a partir de 20 ml de sangue periférico, colhidos em frasco estéril, com EDTA 10% como anticoagulante. A amostra foi centrifugada a 2500 rpm, por 15 minutos. Após o descarte do plasma, os eritrócitos foram lisados com uma mistura de soluções de cloreto de amônio NH_4Cl 0,144M (5 vezes o volume de células) e bicarbonato de amônio NH_4HCO_3 0,01M (0,5 vez o volume de células). Após 15 minutos, em repouso à temperatura ambiente, o hemolisado foi centrifugado a 2500 rpm, por 20 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado de leucócitos lisado em solução de NaCl 0,3M, EDTA 10mM, Tris-HCl 10mM (pH 7,5), 4,2 g de uréia, 1ml de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20%, por 16 horas a 37°C.

Uma mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionada (volume/volume). Após agitação, seguiu-se centrifugação a 2500rpm, por 20 minutos. A fase aquosa superior foi transferida para outro tubo estéril, repetindo-se o procedimento acima. Uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foi então adicionada (volume/volume) repetindo-se a centrifugação.

Seguindo-se à transferência da fase aquosa para um novo tubo, a precipitação do ácido nucleico foi conduzida pela adição de acetato de sódio 3M pH 5,3 (10% do volume) e etanol absoluto gelado (três vezes o volume).

O DNA foi solubilizado em água destilada, deionizada, estéril e teve sua concentração estimada em espectrofotômetro, através do valor da densidade óptica em comprimento de onda = 260nm.

2. Amplificação Gênica pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

1 μ g de DNA genômico foi amplificado diretamente através da reação em cadeia da polimerase (PCR), segundo o método descrito por Saiki *et al.*, 1988, com algumas modificações. A reação foi feita usando um ciclador de temperatura Perkin-Elmer Cetus em reações de 100 μ l, contendo 10mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50mM de cloreto de potássio (KCl), 1,5mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 0,01% de gelatina, 200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,1 μ M de cada iniciador ("primer"*) e 2U de Taq polimerase (BRL). Ao volume final foram adicionadas 30 μ l de óleo mineral. As condições da reação consistiram de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos que compreendiam desnaturação a 94°C, por 90 segundos, anelamento a 55°C, por 90 segundos e extensão a 72°C, por 120 segundos. O último ciclo teve o período de extensão prolongado por 7 minutos. Os produtos da reação foram separados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e visualizados sob iluminação ultravioleta.

* os "primers" utilizados são apresentados na Tabela II e Figura 7.

3. Extração de RNA:

A extração de RNAm de reticulócitos foi feita com 10 a 20ml de sangue periférico, o qual foi lavado com solução salina isotônica e centrifugado a 2500 rpm, por 15 minutos. Os eritrócitos, obtidos após descarte do plasma, foram lisados com uma mistura de cloreto de amônio 0,144M (5 vezes o volume de células) e bicarbonato de amônio 0,01M (0,5 vez o volume de células). O hemolisado foi centrifugado a 2500 rpm, por 20 minutos, o sobrenadante removido e acrescido de gotas de ácido acético 10% até o pH desta solução atingir o valor 5,0. Após centrifugação a 12000 rpm, por 20 minutos, o precipitado foi ressuscitado em 10ml de 100mM Tris (pH 9,0), 100mM NaCl, 0,5% SDS, 1mM EDTA. A seguir foi feita extração com uma mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico conforme anteriormente descrito no procedimento para isolamento de DNA. Geralmente, 100 a 400 μ g de RNA total puderam ser obtidos por amostra.

O RNA foi solubilizado em água destilada, deionizada, estéril e teve sua concentração estimada em espectrofotômetro, através do valor da densidade óptica em comprimento de onda = 260nm.

4. Síntese de cDNA pela transcriptase reversa e amplificação do fragmento (RT-PCR):

Cerca de 10 μ g de RNA total foram usados para síntese de cDNA em cada reação de transcrição reversa. A amostra de RNA foi incubada a 42°C, por 2 horas em uma reação com volume total de 30 μ l, contendo 2mM de cada dNTP, 50mM de NaCl, 34mM Tris-HCl (pH 8,3), 6mM de MgCl₂, 5mM de ditiltreitol (DTT), 5 μ M de iniciador em orientação contrária ao sentido da leitura do gene da globina ("primer antisense" - β 2*), 20U de inibidor de RNases (RNasin - Promega Corporation, Madison, WI), and 2U de transcriptase reversa (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD). A reação em cadeia da polimerase foi feita como descrito anteriormante para amplificação de DNA genômico. Utilizou, neste caso, uma alíquota de 2 μ l do produto da transcriptase reversa e os "primers" β 1, β 2 e 39*.

* os "primers" utilizados são apresentados na Tabela II e Figura 7.

5. Identificação das Mutações

a. Polimorfismo de conformação em hélice simples (SSCP - Single Strand Conformation Polymorphism)

Em alguns casos levamos a efeito o rastreamento das regiões dos "exons" que continham mutações pelo método de polimorfismo de conformação em hélice simples (SSCP), conforme originalmente descrito por Orita e colaboradores (1989 a e b).

1 μ g de DNA genômico foi amplificado por PCR como descrito anteriormente, com acréscimo de 10 μ Ci de [α ³²P] ATP (3000 Ci/mmol, 10mCi/ml, Amersham). À uma alíquota de 5 μ l do produto da reação foram adicionados 5 μ l de uma solução contendo formamida 95%, 10mM de EDTA pH 8,0, 0,1% de azul de bromofenol e 0,1% de xileno cianol. Desta mistura, 4 μ l, desnaturados a 100^oC por 10 minutos, foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, em placas de 40x34cm e 0,4mm de espessura (aparato GIBCO-BRL), contendo tampão (Tris-borato 90mM pH 8,3 , EDTA 4mM) e 10% de glicerol, por 18 horas a 7W (fonte BioRad 3000Xi). O tampão utilizado na eletroforese foi o mesmo usado na preparação do gel. A autorradiografia foi obtida após exposição do gel seco em filme de raio X, sem intensificador, por 16 horas.

b. Sequenciamento

O sequenciamento foi feito utilizando dsDNA Cycle Sequencing System (BRL) ou fmolTM DNA Sequencing System (Promega).

Purificação do DNA: Aproximadamente 200fmol de DNA, produto de amplificação por PCR, diluídos em água de forma a atingir o volume de 20 μ l, receberam 20 μ l de acetato de amônio 4M e 160 μ l de isopropanol. A mistura foi mantida por 10 minutos à temperatura ambiente e a seguir foi centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi então lavado com etanol 70% e ressuspensionado em 20 μ l de água destilada.

Marcação do iniciador ("primer"): "Primers" internos ou os mesmos utilizados na amplificação* foram marcados radioativamente em reações de 5 μ l, contendo 60mM Tris-HCl (pH 7,8); 10mM MgCl₂; 0,2mM KCl; 1pmol de "primer"; 2pmol de [γ -³²P] ATP 5000 Ci/mmol - 10mCi/ml (Amersham), 1U T4 polinucleotídeo kinase, incubados por 30 minutos a 37°C, seguidos por 5 minutos a 55°C e então dispostos em gelo.

* os "primers" utilizados são apresentados na Tabela II e Figura 7.

Reação: Aos 5 μ l de "primer" marcado foram adicionados 37,5mM Tris-HCl (pH 9,0); 6,25mM MgCl₂; 37,5mM KCl; 50fmol do DNA a ser sequenciado purificado; 2,5U Taq DNA polimerase, para um volume final de 36 μ l. Alíquotas de 8 μ l desta mistura foram adicionadas a 4 tubos diferentes: o primeiro contendo 2mM de ddATP e 50 μ M de cada dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP e dTTP, o segundo 1mM de ddCTP e 50 μ M de cada dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, e dTTP, o terceiro 0,2mM ddGTP e 50 μ M de cada dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, e dTTP e o quarto tubo 2mM de ddTTP e 50 μ M de cada dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, e dTTP. A seguir, essas misturas foram submetidas a 20 ciclos de 30 segundos (s) a 95°C, 30s a 55°C, 60s a 70°C e 10 ciclos de 30s a 95°C e 60s a 70°C. As reações foram interrompidas com 5 μ l de solução contendo formamida 95%, 10mM de EDTA pH 8,0, 0,1% de azul de bromofenol e 0,1% de xileno cianol, e então submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, tampão (Tris-borato, pH 8,3 90 mM, EDTA 4mM) e uréia 7M, em placas de 40x34cm e 0,4mm de espessura (aparato GIBCO-BRL), por 4 horas a 1500 volts (fonte BioRad 3000Xi). O tampão utilizado na eletroforese foi o mesmo usado na preparação do gel. A autorradiografia foi obtida após exposição do gel seco em filme de raio X, sem intensificador, por 16 horas.

Tabela II. Seqüências de "primers" utilizados:

Nome do "primer"	Seqüência 5' - 3'	Sentido	Posição em relação ao Cap
108	GCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATC	"sense"	- 140*
303	GGACCAGCATAAAAGGCAG	"sense"	- 39**
β 1	TTTGCTTCTGACACAACGT	"sense"	+ 2*
16	GCAGGTTGGTATCAAGGTT	"sense"	+ 131*
P3	AGACAGAGAAGACTCTTG	"sense"	+ 198*
39	CCTTGACCCAGAGGTTCT	"sense"	+ 269*
46	CTCATGGCAAGAAAGTGCTC	"sense"	+ 348*
109	CCCTTCTTCTATGACATGAACTTAACCAT	"antisense"	+ 521*
58	AATCCAGCTACCATTCTGC	"sense"	+ 1214*
β 2	TCCAGATGCTCAAGGCCCTTC	"antisense"	+ 1556*
P7	GACCTCCCACATTCCTTTT	"antisense"	+ 1645*
230	GTATTTTCCCAAGGTTTGAAGTAGCTC	"antisense"	+ 1693*

* no gene da globina β

** no gene da globina δ .

"sense" = 5' - 3'

"antisense" = 3' - 5'

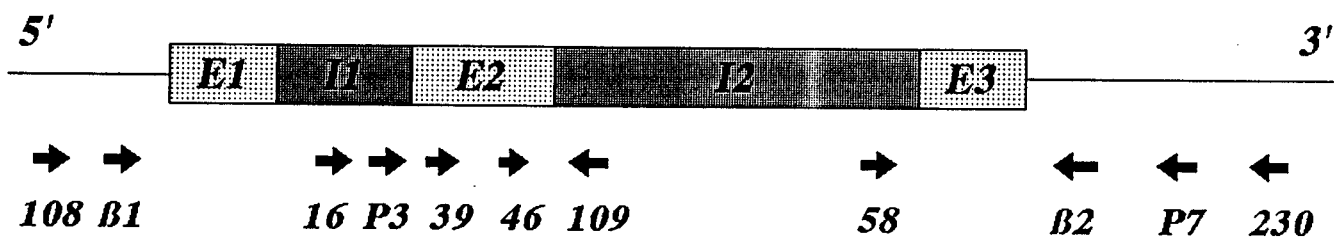


Figura 7. Posicionamento dos "primers" utilizados com relação ao gene da globina β (I. "intron", E. "exon").

c. Digestão dos produtos amplificados com enzimas de restrição:

Naqueles casos em que a mutação interferia com sítios de enzimas de restrição os pacientes foram analisados por esta técnica.

Uma alíquota de 5 μ l do produto da amplificação do DNA genômico dos paciente portador de Hb D, com utilização dos "primers" P3 e P7, foi digerida utilizando 0,02 μ g de BSA, 5mM de acetato de potássio, 2mM de Tris-acetato, 1mM de acetato de magnésio, 0,1mM de DTT e 2U de EcoRI, a 37°C por 16 horas.

Uma alíquota de 5 μ l do produto da amplificação do DNA genômico dos pacientes portadores da variante Zürich, com utilização dos "primers" P3 e 109, foi digerida utilizando 0,02 μ g de BSA, 5mM de acetato de potássio, 2mM de Tris-acetato, 1mM de acetato de magnésio, 0,1mM de DTT e 2U de NlaIII, a 37°C por 16 horas.

Uma alíquota de 5 μ l do produto da amplificação do DNA genômico da paciente portadora de Hb Camperdown, utilizando os "primers" 16 e 109, foi digerida utilizando 5mM de acetato de potássio, 2mM de Tris-acetato pH 7,9, 1mM de acetato de magnésio, 0,1mM de DTT e 2U de HphI, a 37°C por 16 horas.

Os produtos da digestão foram separados em gel de agarose (0,8 a 4%), corado com brometo de etídio e visualizados sob iluminação ultravioleta.

d. Hibridização com oligonucleotídeos alelo específicos (ASO):

No caso em que a mutação não altera sítios de restrição de enzimas (Hb Köln) foi utilizado o método de hibridização com oligonucleotídeos alelo específicos (ASO - allele specific oligonucleotide).

Fixação do DNA amplificado em filtros de nylon: Foram utilizados 50 μ l de DNA amplificado com os "primers" 108 e 109 (Tabela II e Figura 7) para cada amostra, acrescidos de 350 μ l de solução de NaOH 0,4N e EDTA 25mM. Após homogeneização vigorosa, a mistura foi deixada em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi

aquecida a 95°C por 2 minutos e colocada em gelo até ser aplicada a duas membranas de nylon, por sucção à vacuo, no sistema de "dot-blot", com posterior fixação por aquecimento a 80°C por 2 horas. 200µl da mistura foram aplicados a cada membrana, de tal forma que as duas membranas fossem exatamente iguais (duplicatas), sendo uma delas hibridizada com a sonda normal e a outra com a sonda mutante.

Marcação das sondas com isótopos radioativos: Duas sondas foram empregadas nesta investigação, uma complementar à seqüência normal da região da mutação que causa a variante Köln e outra complementar à seqüência mutante (normal - 5'-CTCAGGATCCAÇGTGCCGC-3', localizada na posição +428 com relação ao sítio Cap; mutante - 5'-CTCAGGATCCATGTGCCGC-3', na mesma localização).

A reação de marcação radioativa foi realizada em solução contendo 10pmoles da sonda, 15U de T4 polinucleotídeo quinase (USB), 8µl de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (5000Ci/mmol; 10µCi/µl Amersham), em tampão 50mM Tris-HCl pH 7,6, 10mM MgCl₂, 0,5mM DTT, 0,1mM espermidina, 0,1mM EDTA com volume final de 50µl (modificado de Sambrook *et al.*, 1989). A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas, parando-se a reação com 100µl de TNE (10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM EDTA). Foi feita uma extração (volume/volume) com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e uma extração (volume/volume) com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após purificação em coluna de Sephadex G50, a eficiência da marcação foi avaliada pela leitura da radioatividade de 1µl de sonda em 3ml de líquido de cintilação no contador de cintilação líquida LS 5000 TA-Beckman.

Pré-hibridização: Os filtros foram colocados no interior de um recipiente plástico flexível contendo 10ml de tampão de hibridização (5X SSPE#, 5X Denhardt's## e SDS 0,5%) e incubados por 2 horas à temperatura de 48°C.

SSPE 20X: 175,3g NaCl, 27,6g NaH₂PO₄H₂O, 7,4g EDTA, água q.s.p. 1000ml.

Denhardt's 50X: 5g Ficoll 400, 5g, polivinilpirrolidone, 5g BSA (bovine serum albumine), água q.s.p. 500ml.

Hibridização: Seguindo-se a pré-hibridização, as sondas previamente marcadas radioativamente foram adicionadas aos recipientes plásticos, após desnaturação a 95°C por 2 minutos, e incubadas por 16 horas à temperatura de 48°C.

Lavagens: Foram realizadas 3 lavagens, sendo as 2 primeiras em temperatura ambiente, por 5 e 10 minutos, em solução contendo 2X SSPE e 0,1% SDS. E a última lavagem à temperatura de 62°C por 5 minutos, em solução contendo 5X SSPE e 0,15% SDS. Após a hibridização, os filtros foram secos e expostos em filme de raio X por 16 horas, a -70°C, com utilização de intensificadores de imagens para autorradiografia.

e. Determinação dos haplótipos do complexo gênico da globina β :

A determinação dos haplótipos, no paciente portador da variante Lepore, foi feita utilizando DNA preparado a partir de sangue periférico, conforme descrito previamente. Os fragmentos foram obtidos através da reação em cadeia da polimerase. A amplificação da região do sítio polimórfico foi seguida por digestão de uma alíquota de 5 μ l, com enzima apropriada. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, contendo brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Os seguintes sítios de restrição foram analisados: XmnI na posição -158 do gene G_γ , HindIII em IVS2 do gene G_γ , HindIII em IVS2 de G_γ , HincII em $\Psi\beta$, HincII na extremidade 3' de $\Psi\beta$, HinfI na extremidade 5' de β , AvaII em IVS2 de β e HpaI na extremidade 3' de β .

A direção, posição e seqüências dos "primers" estão demonstradas na Tabela III e Figura 8, com exceção do sítio AvaII que foi determinado por sequenciamento direto.

Tabela III - Direções, posições e seqüências dos "primers" utilizados na determinação dos haplótipos.

Nome do "primer"	Seqüência 5' - 3'	Sentido	Posição	Sítio polimórfico	Gene
A350	AACTGTTGCTTTATAGGATT	"sense"	33880	XmnI 34330	5' G_γ
A351	AGGAGCTTATTGATAACTCA	"antisense"	34535		
H2	AAGTGTGGAGTGTGCACATG	"antisense"	36221	HindIII 35785 / 40731	G_γ/A_γ
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTAC	"sense"	35440 / 40371		
H4	TAAATGAGGAGCATGCACACA	"antisense"	41137		
H5	GAACAGAAGTTGAGATAGAG	"sense"	46458	HincII 46819	$\Psi\beta$
H6	ACTGACTGGTCTTGTGGGCT	"antisense"	47159		
H7	TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	"sense"	49529	HincII 49826	3' $\Psi\beta$
H8	GGACCCTAACTGATATAACTA	"antisense"	50121		
H9	CTACGCTGACCTCATAAATG	"sense"	60958	HinfI 61199	5' β
H10	CTAATCTGCAAGAGTGTCT	"antisense"	61341		
H11	TTCATACATAACAATACTCA	"sense"	69238	HpaI 69705	3' β
H12	GAGGAGAGCTTTACTTCCAA	"antisense"	69866		

"sense" = 5' - 3'

"antisense" = 3' - 5'

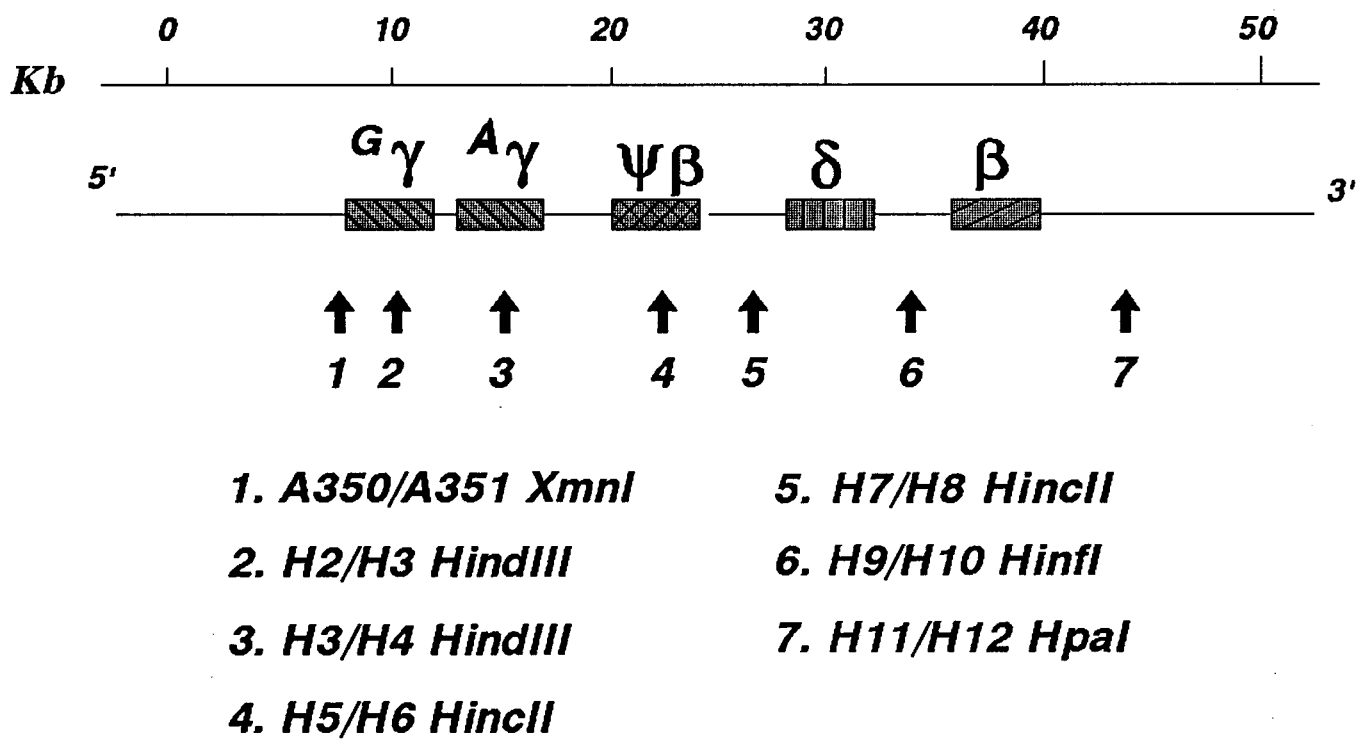


Figura 8. Posicionamento dos "primers" utilizados na análise de haplótipos, com as respectivas enzimas de restrição utilizadas na digestão dos fragmentos amplificados por estes "primers".

RESULTADOS

Família 1

Dados hematológicos:

Os dados hematológicos e de eletroforese de hemoglobina da paciente e familiares encontram-se na Tabela IV.

Tabela IV. Dados laboratoriais da paciente e familiares:

	Hb (g/dl)	Ht (%)	GV ($\times 10^{12}/l$)	VCM (fl)	HCM (pg)	HbF (%)	HbA ₂ (%)	Eletroforese de Hb	Solubilidade (%)
Paciente	8,5	25	2,4	102	34	9,0	2,0	A ₂ +S+X	30
Irmão	14,6	42	4,9	85	30	0,4	2,4	A ₂ +X+A	93
Irmã	13,2	40	4,5	88	29	0,5	2,1	A ₂ +S+A	36
Mãe	13,7	41	4,6	89	29	0,7	2,2	A ₂ +X+A	98
Pai	15,4	44	4,7	93	32	0,4	2,0	A ₂ +S+A	35

Eletroforese de hemoglobina:

A eletroforese em acetato de celulose pH 8,9 mostrou no paciente padrão típico de homocigoto SS (Hb A₂ e Hb S). No entanto, em gel de agar pH 6,1 houve migração nas posições de Hb S e Hb A. Além disso, a solubilidade em tampão fosfato 2,87M era elevada, típica de heterocigotos AS. Esses dados indicavam a possibilidade de associação Hb S e Hb D. A presença de possível Hb D foi também observada na mãe, e no irmão da paciente. O pai e a irmã eram heterocigotos AS.

Deteção da anormalidade molecular:

A mutação que origina a HbD-Punjab (Ácido Glutâmico - Glutamina (GH4) é uma substituição de uma única base no "codon" 121 do gene da globina β (GAA-CAA).

Com o objetivo de analisar essa região, a amostra de DNA da paciente foi amplificada pela PCR, gerando 1 fragmento do gene da globina β com 352 pares de bases, com o emprego dos "primers" 58 e $\beta 2$ (Tabela II).

A reação de sequenciamento foi conduzida com os mesmos "primers" utilizados na amplificação. Na Figura 9 podemos observar que na região prevista existem duas bandas situadas na mesma posição (G e C), indicando claramente a existência de dois nucleotídeos nessa região. Esse achado, como esperado a partir dos dados de eletroforese, indica que concomitantemente ao "codon" GAA (codificando o resíduo de aminoácido Ácido Glutâmico) temos o "codon" CAA (codificando o resíduo de aminoácido Glutamina), confirmando tratar-se da Hb D.

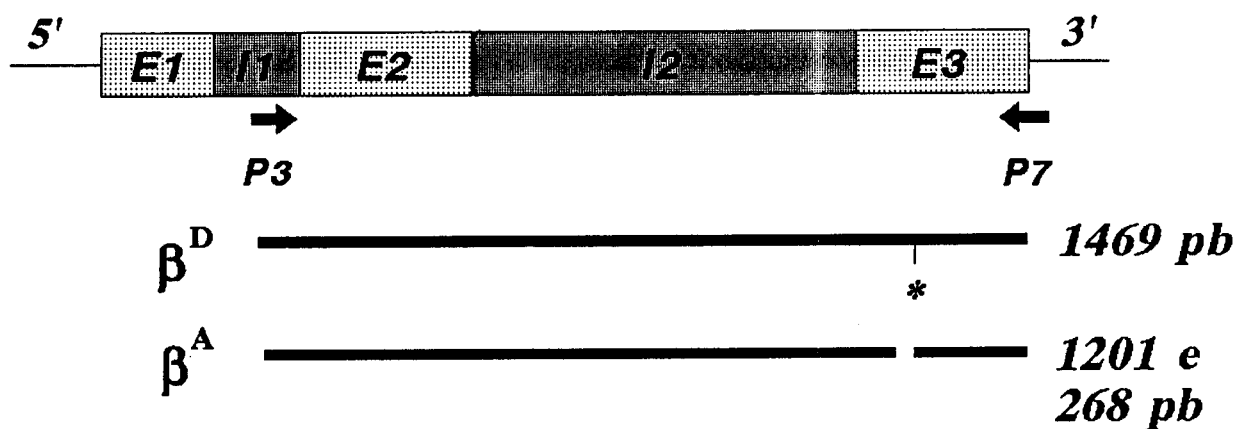
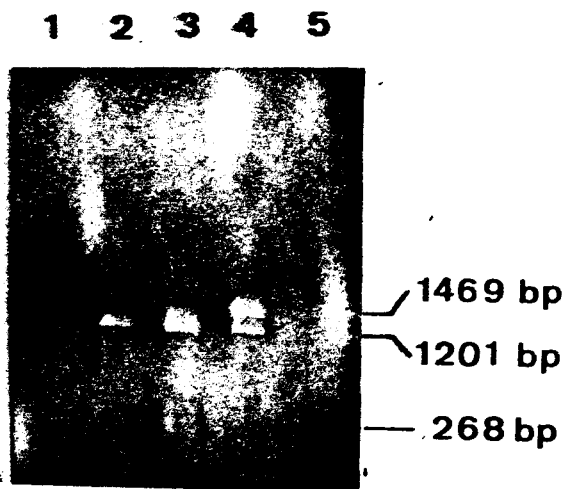


Figura 9. Autorradiografia do gel de sequenciamento do paciente portador da associação Hb S/Hb D. Amplificação com os "primers" 58 e $\beta 2$ e sequenciamento com o "primer" 58. A ocorrência de G e C no "codon" $\beta 121$ está indicada pela seta. Este dado indica dois codons: GAA (Ácido Glutâmico) e CAA (Glutamina) nessa posição.

Esta alteração remove o sítio de reconhecimento da enzima Eco RI (5'-G/AATTC-3') normalmente localizado nesta região. Assim, DNA normal, amplificado com os "primers" P3 e P7, pode ser clivado pela enzima de restrição Eco RI produzindo dois fragmentos, de 1201 e 268 pares de bases. Entretanto, DNA, de portadores de HbD-Punjab, amplificado com os mesmos "primers" originam três fragmentos após a digestão: os dois normais (1201 e 268 pares de bases) e o fragmento intacto de 1469.

No paciente estudado foi observado padrão típico de heterozigose de HbD (fragmentos de 1469, 1201 e 268 pares de bases), confirmando assim, de uma maneira rápida, que o paciente é um heterozigoto para HbS e HbD (Figura 10).

Desse modo, a análise de DNA por sequenciamento e pela digestão de fragmento amplificado com a enzima EcoRI comprovam que o paciente analisado era portador da associação Hb S e Hb D, como sugerido pela eletroforese de hemoglobinas.



*** Sítio de restrição da enzima *EcoRI***
5'-G/AATTC-3'

Figura 10. Acima: eletroforese em agarose 0,8% de fragmentos de DNA genômico amplificados por PCR e digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* (1 e 3 - controles normais; 2 - homozigoto para HbS; 4 - propósito: HbS/HbD). Abaixo: representação esquemática do gene da globina β , demonstrando a posição dos "primers" utilizados, bem como os fragmentos de PCR e digestão.

Família 2

Dados hematológicos:

Os dados hematológicos e de eletroforese de hemoglobina da paciente e familiares encontram-se na Tabela V.

Tabela V. Dados laboratoriais da paciente e familiares:

	Hb (g/dl)	Ht (%)	GV (x10 ¹² /l)	VCM (fl)	HCM (pg)	HbF (%)	HbA ₂ (%)	Eletroforese de Hb	Solubilidade (%)
Paciente	11,6	34	3,8	91	31	1,3	3,4	A ₂ + A + X (26,9%)	73,8
Irmão	14,4	43	4,7	91	30	1,4	3,6	A ₂ + A + X (22%)	84,8
Irmã	11,3	35	3,6	96	31	1,4	3,1	A ₂ + A + X (25,8%)	72,3
Mãe	15,3	44	4,9	88	31	-	2,7	A ₂ + A	88,3
Pai	14,3	43	4,2	102	34	1,2	3,7	A ₂ + A + X (28,7%)	77,7
Sobrinho	15,0	44	4,5	98	33	0,9	2,9	A ₂ + A + X (22%)	85,5

Eletroforese de hemoglobina:

A eletroforese em acetato de celulose pH 8,9 mostrou uma variante de cadeia β com migração mais lenta que a hemoglobina A (Figura 11). O estudo da instabilidade térmica e o teste de precipitação pelo isopropanol foram positivos para hemoglobina instável. Corpúsculos de Heinz foram detectados em esfregaços de sangue periférico da paciente (Dacie & Lewis, 1984). A análise da globina β variante por digestão com tripsina e análise de aminoácidos sugeriam fortemente a possibilidade da hemoglobina anormal ser a Hb Zürich (Zago *et al.*, 1988).

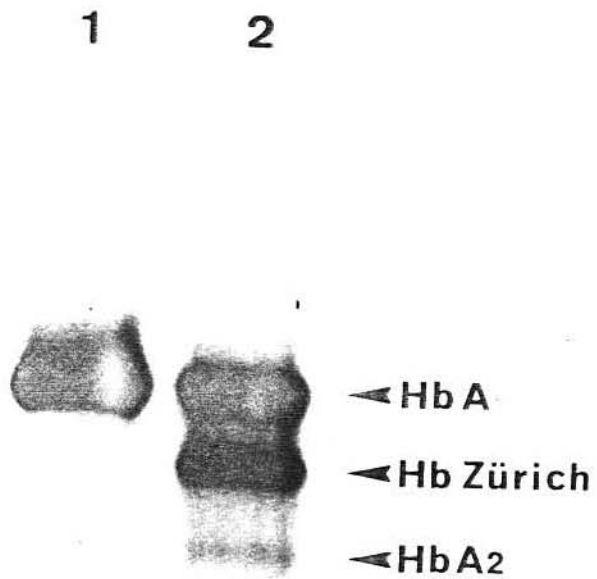


Figura 11. Eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose, tampão Tris-EDTA-borato pH 8,9. **1.** controle normal **2.** paciente portador de Hb Zürich.

Deteccão da anormalidade molecular:

A hemoglobina Zürich é uma variante instável onde o aminoácido Histidina distal, na posição 63(E7) da cadeia da globina β , é substituído por Arginina, causando uma mudança na conformação espacial da proteína. A mutação que causa a Hb Zürich decorre da substituição de uma única base no "codon" 63 do gene da globina β (CAT-CGT).

Com o objetivo de analisar essa região, amostra de DNA da paciente foi amplificada pela PCR, gerando 1 fragmento do gene da globina β com 428 pares de bases, com o emprego dos "primers" 16 e 109 (Tabela II).

A reação de sequenciamento foi conduzida com o "primer" interno 39. Na Figura 12 podemos observar que na posição prevista existem duas bandas situadas na mesma posição (A e G), indicando claramente a existência de dois nucleotídeos nessa região. Esse achado, como esperado a partir dos dados de eletroforese, indica que concomitantemente ao "codon" CAT (codificando o resíduo de aminoácido Histidina) temos o "codon" CGT (codificando o resíduo de aminoácido Arginina), confirmando tratar-se da Hb Zürich.

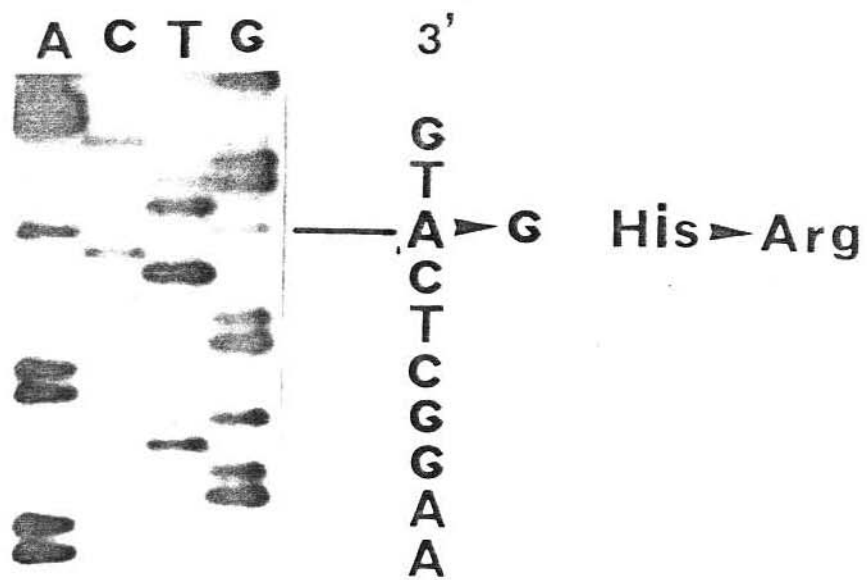
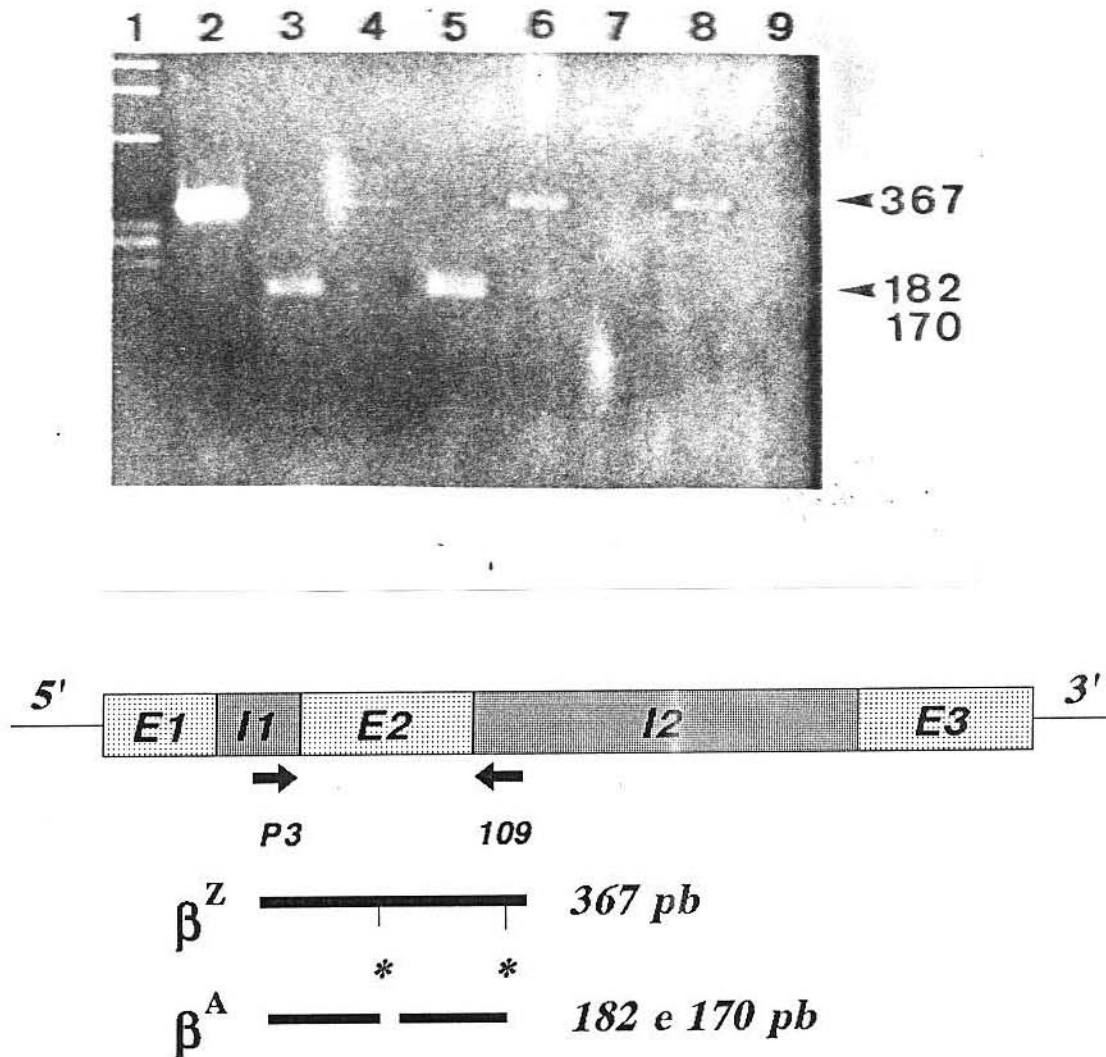


Figura 12. Sequenciamento do fragmento de DNA de portador de Hb Zürich, amplificado com os "primers" 16 e 109 e sequenciado com o "primer" interno 39. A substituição de CAT - CGT no "codon" 63 do gene da globina β , que resulta na alteração do aminoácido Histidina para Arginina encontra-se representada.

Esta alteração remove o sítio de reconhecimento da enzima NlaIII (5' CATG/ 3'), normalmente localizado nesta região do DNA. Desta forma, DNA normal amplificado com o par de "primers" P3 e 109 resulta em um fragmento de 367 bp, e pode ser clivado pela enzima NlaIII, gerando dois fragmentos de 182 e 170 pares de bases (pb). Entretanto, DNA de portadores de Hb Zürich, quando amplificado por PCR gera três fragmentos após digestão: os dois normais (182 e 170 pb) e o fragmento intacto de 367 pb, como demonstrado na Figura 13.

Nessa família a identificação da hemoglobina variante foi confirmada pelo sequenciamento de DNA e um procedimento rápido foi desenvolvido com digestão do fragmento amplificado pela enzima NlaIII. Confirmando, desta forma, que a paciente, sua irmã e seu sobrinho eram portadores da Hb Zürich.



*** Sítio de restrição da enzima NlaIII
5'-CATG/-3'**

Figura 13. Acima: eletroforese em agarose 0,8% de fragmentos de DNA genômico amplificados por PCR e digeridos com a enzima de restrição NlaIII (1. Marcador ϕ X174 HaeIII, 2. fragmento amplificado e não digerido, 3 a 9. digestões: 3. DNA controle, 4. pai, 5. mãe, 6. paciente, 7. cunhado, 8. irmã, 9. sobrinho. Os heterozigotos para Hb Zürich apresentam 3 fragmentos (367, 182 e 170 pares de bases (pb) - Linhas 4, 6, 8 e 9. Os fragmentos de 182 e 170 pb não são possíveis de serem discriminados neste tipo de eletroforese, sendo visualizados como uma banda única. Abaixo: representação esquemática do gene da globina β , demonstrando a posição dos "primers" e os fragmentos antes e após a digestão.

Família 3

Dados hematológicos:

Os dados hematológicos e de eletroforese de hemoglobina dos pacientes encontram-se na Tabela VI.

Tabela V. Dados laboratoriais dos portadores de Hb variante:

	Hb (g/dl)	Ht (%)	GV ($\times 10^{12}/l$)	VCM (fl)	HCM (pg)	HbF (%)	HbA ₂ (%)	Eletroforese de Hb
Paciente	10,3	37	4,0	103	32	2,8	4,7	A ₂ + A + X (7,6%)
Pai	14,9	48	4,5	104	33	1,7	2,2	A ₂ + A + X (10,4%)
Tia	12,0	41	3,9	104	30,5	1,6	2,2	A ₂ + A + X (6,5%)

Eletroforese de hemoglobina:

A eletroforese em acetato de celulose apresentou banda correspondente à hemoglobina anômala entre A₂ e S. E a eletroforese em gel de agar apresentou uma migração eletroforética semelhante a da hemoglobina C.

Os testes de instabilidade térmica e de precipitação pelo isopropanol foram positivos. Foram observados corpúsculos de Heinz no sangue periférico da paciente.

Detecção da anormalidade molecular:

Com o objetivo de identificar a proteína anômala foi levado a efeito os sequenciamentos dos três "exons" do gene da globina β . Um fragmento de 367 pares de bases, correspondente ao "exon" 2, amplificado com os "primers" P3 e 109 foi sequenciado com o "primer" interno 46 e revelou o padrão observado na Figura 14. Na primeira posição do "codon" 98 existem duas bandas, situadas na mesma altura (G e A), indicando claramente a existência de dois nucleotídeos nessa região. Esse achado indica que concomitantemente ao "codon" GTG (codificando o resíduo de aminoácido Valina) temos o "codon" ATG (codificando o resíduo de aminoácido Metionina), tratando-se portanto da Hb Köln.

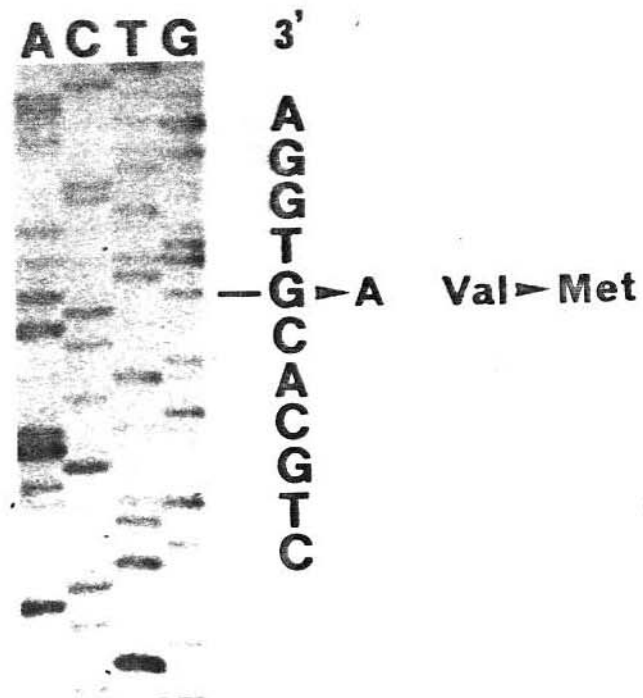


Figura 14. Sequenciamento do fragmento de DNA de portador de Hb Köln, amplificado com os "primers" P3 e 109 e sequenciado com o "primer" interno 46. A substituição de GTG - ATG no "codon" 98 do gene da globina β , que resulta na alteração do aminoácido Valina para Metionina encontra-se representada.

Essa alteração não cria ou abole nenhum sítio conhecido de enzima de restrição. Com o intuito de confirmar essa mutação e também de estabelecer um método rápido de identificação de novos casos foram realizadas hibridizações com oligonucleotídeos alelo específicos. Esse procedimento mostrou claramente que a paciente era heterozigota para Hb Köln (Figura 15).

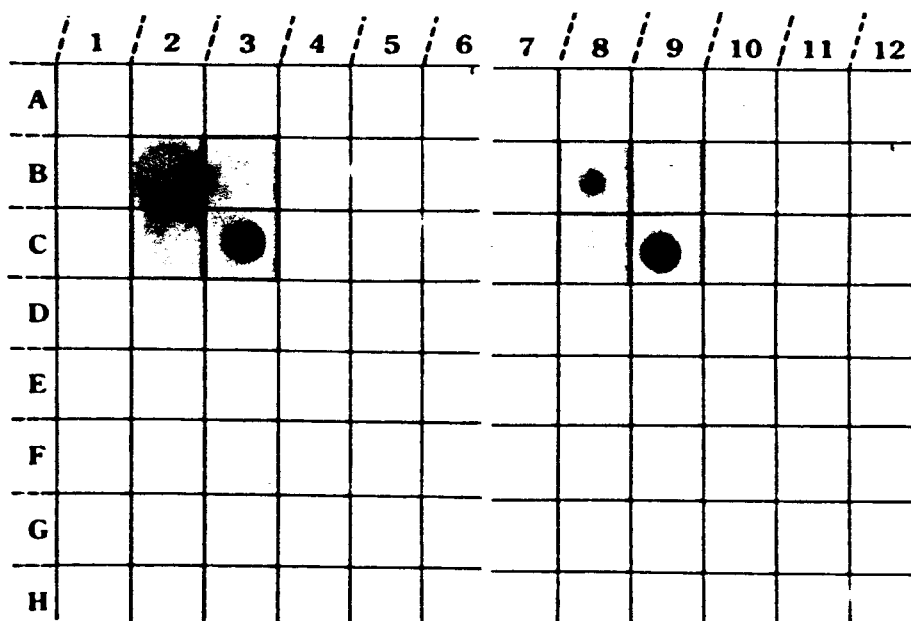


Figura 15. Hibridização alelo-específica. DNA genômico de indivíduo controle normal e do paciente foram amplificados por PCR, utilizando os "primers" 108 e 109, fixados em filtros de nylon por "dot-blot" e hibridizados com sondas de seqüências correspondentes aos alelos normal (1 a 6) e mutante (7a 12): **B2 e B8** - controle normal; **C3 e C9** - paciente. Observar que a reação é positiva no controle somente com a sonda normal (na posição B8 observa-se apenas radiação de fundo, quando comparada à radioatividade na posição B2). Na amostra da paciente há positividade para ambas as sondas. (observar a mesma intensidade de radioatividade nas duas posições), B2. DNA controle normal hibridizado com sonda normal, B8. DNA controle normal hibridizado com sonda mutante, C3. DNA da paciente hibridizado com sonda normal, C9. DNA da paciente hibridizado com sonda mutante.

Paciente 4

Dados hematológicos:

Os dados hematológicos da paciente estão demonstrados na Tabela VII.

Tabela VII. Dados laboratoriais da paciente com Hb variante:

	Hb (g/dl)	Ht (%)	GV ($\times 10^{12}/l$)	VCM (fl)	HCM (pg)	HbF (%)	HbA ₂ (%)	Eletroforese de Hb	Solubilidade (%)
Paciente	13,4	41	4,2	88	29	0,3	2,7	A ₂ + A + X	79,2

Eletroforese de hemoglobina:

A eletroforese em acetato de celulose tampão TEB pH 8,9 demonstrou a presença de uma hemoglobina com migração aparentemente mais rápida que a Hb A. Embora não se observasse separação nítida da hemoglobina A, o limite mais avançado encontrava-se a frente dos controles normais. A eletroforese em gel de agar mostrou padrão de migração próximo a Hb F. A separação das cadeias de globina em eletroforese de poliacrilamida-uréia-TritonX evidenciou uma variante de cadeia β com migração mais lenta que a normal (Figura 16).

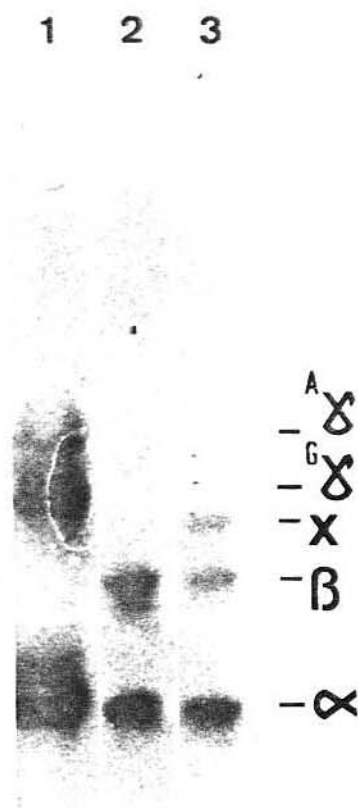


Figura 16. Eletroforese das cadeias de globina em gel de poliacrilamida-uréia-TritonX. **Linha 1:** representa as cadeias observadas em amostra de recém-nascido; **Linha 2:** hemolisado controle normal de adulto; **Linha 3:** hemolisado da paciente (observar a banda de migração anômala X).

Detecção da anormalidade molecular:

O rastreamento da região da mutação foi levada a efeito pelo método de polimorfismo de conformação de hélice simples ("SSCP"). Este método permite uma análise rápida de fragmentos do gene (em geral fragmentos de 300 a 400 pares de bases).

A comparação do padrão de migração do DNA controle com aquele do paciente estudado permite a identificação da região onde ocorreu a mutação. Três reações de amplificação foram feitas a fim de serem obtidos fragmentos dos três "exons" do gene da globina β . Os "primers" β_1 e 109; P3 e 109; e 58 e β_2 foram utilizados para amplificar respectivamente os "exons" 1, 2 e 3. Na Figura 17 é possível observar a eletroforese dos fragmentos referentes aos "exons" 1 (linhas 1 a 5) e 2 (linhas 6 a 10). As linhas 8 e 9 apresentam amostras com padrão anormal quando comparadas aos controles 7 e 10. A linha 8 corresponde ao paciente e a linha 9 corresponde ao controle positivo (Hb Zürich, com mutação no "codon" 63 da globina β).

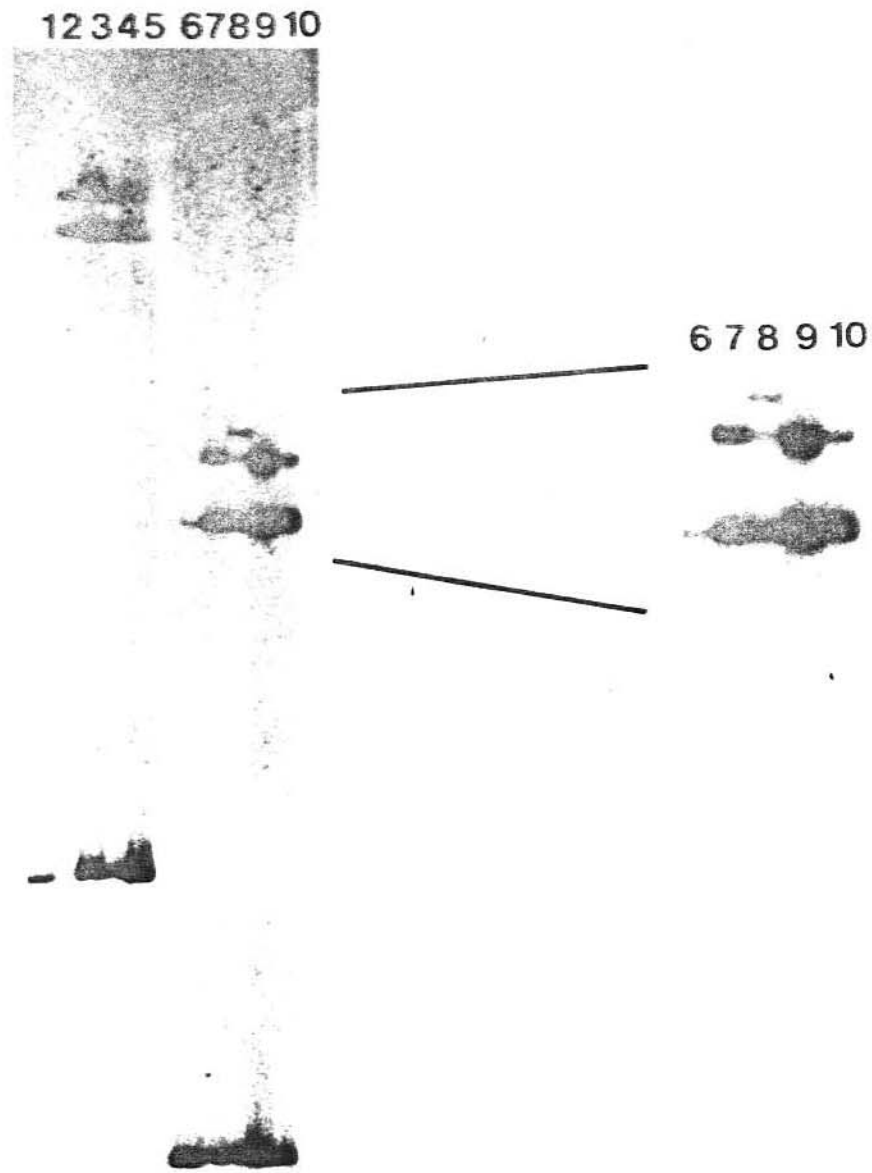


Figura 17. Autorradiografia do gel de poliacrilamida utilizado na análise de polimorfismo de conformação em hélice simples (SSCP). **Linhas 1 a 5:** Produtos de amplificação com os "primers" $\beta 1$ e 109, que envolvem os "exons" 1 e 2; **Linhas 6 a 10:** Produtos de amplificação com os "primers" P3 e 109, que envolve o "exon" 2; **Linhas 1 e 6:** Fragmento não desnaturado; **Linhas 2, 5, 7 e 10:** DNA controle normal; **Linhas 3 e 8:** DNA da paciente; **Linhas 4 e 9:** DNA controle positivo (Hb S e Hb Zurich, respectivamente). Observar padrão de migração anômalo no DNA da paciente e Hb Zürich (setas) em comparação aos controles normais. a. padrão de migração do DNA desnaturado, b. padrão de migração de DNA não-desnaturado.

Com o objetivo de analisar essa região, amostra de DNA da paciente foi amplificada pela PCR com a obtenção de fragmento do gene da globina β com 367 pares de bases ("primers" P3 e 109) (Tabela II).

A reação de sequenciamento foi conduzida com os "primers" 46 e 109. Na Figura 17 podemos observar que na terceira posição do "codon" 104 existem duas bandas situadas na mesma posição (G e C), indicando claramente a existência de dois nucleotídeos nessa região. Esse achado indica que concomitantemente ao "codon" AGG (codificando o resíduo de aminoácido Arginina) temos o codon AGC (codificando o resíduo de aminoácido Serina), tratando-se portanto da Hb Camperdown.

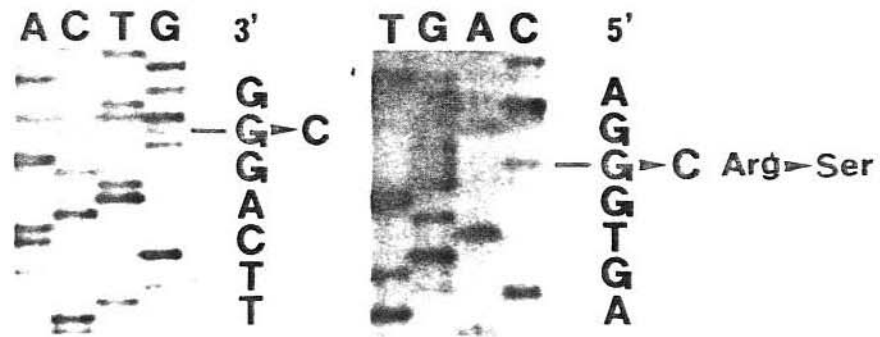


Figura 18. Sequenciamento do fragmento de DNA de portador de Hb Camperdown, amplificado com os "primers" P3 e 109 e sequenciado com os "primers" 46 e 109. A substituição de AGG - AGC no "codon" 104 do gene da globina β , que resulta na alteração do aminoácido Arginina para Serina encontra-se representada. O sequenciamento da esquerda mostra o resultado obtido com o "primer sense" 46 (5' - 3') e o da direita com o "primer antisense" 109 (3' - 5').

No sentido de confirmar a alteração demonstrada pelo sequenciamento foi feita a digestão do fragmento amplificado com a enzima HphI. A mutação remove o sítio de reconhecimento desta enzima (5'-GGTGA(8/7)-3'), presente no codon 104 do gene da globina β . O fragmento amplificado com os "primers" 16 e 109 gera um fragmento de 428 pares de bases. Nesse fragmento a enzima possui dois locais de clivagem. Um deles é independente da mutação, o outro pode ser removido nos pacientes portadores da mutação. Desta forma, DNA normal amplificado com os "primers" 16 e 109 pode ser clivado pela HphI gerando 3 fragmentos, um fragmento constante de 220 pares de bases e dois outros de 120 e 70 pares de bases (pb). Entretanto, o gene anômalo deve originar apenas 2 fragmentos após a digestão, o fragmento constante de 220 pb e um fragmento intacto com 190 pb. Os heterozigotos para essa mutação apresentarão 4 fragmentos, o fragmento constante de 220 pb e os fragmentos (190 pb) e (120 e 70 pb) correspondentes respectivamente aos alelos mutante e normal.

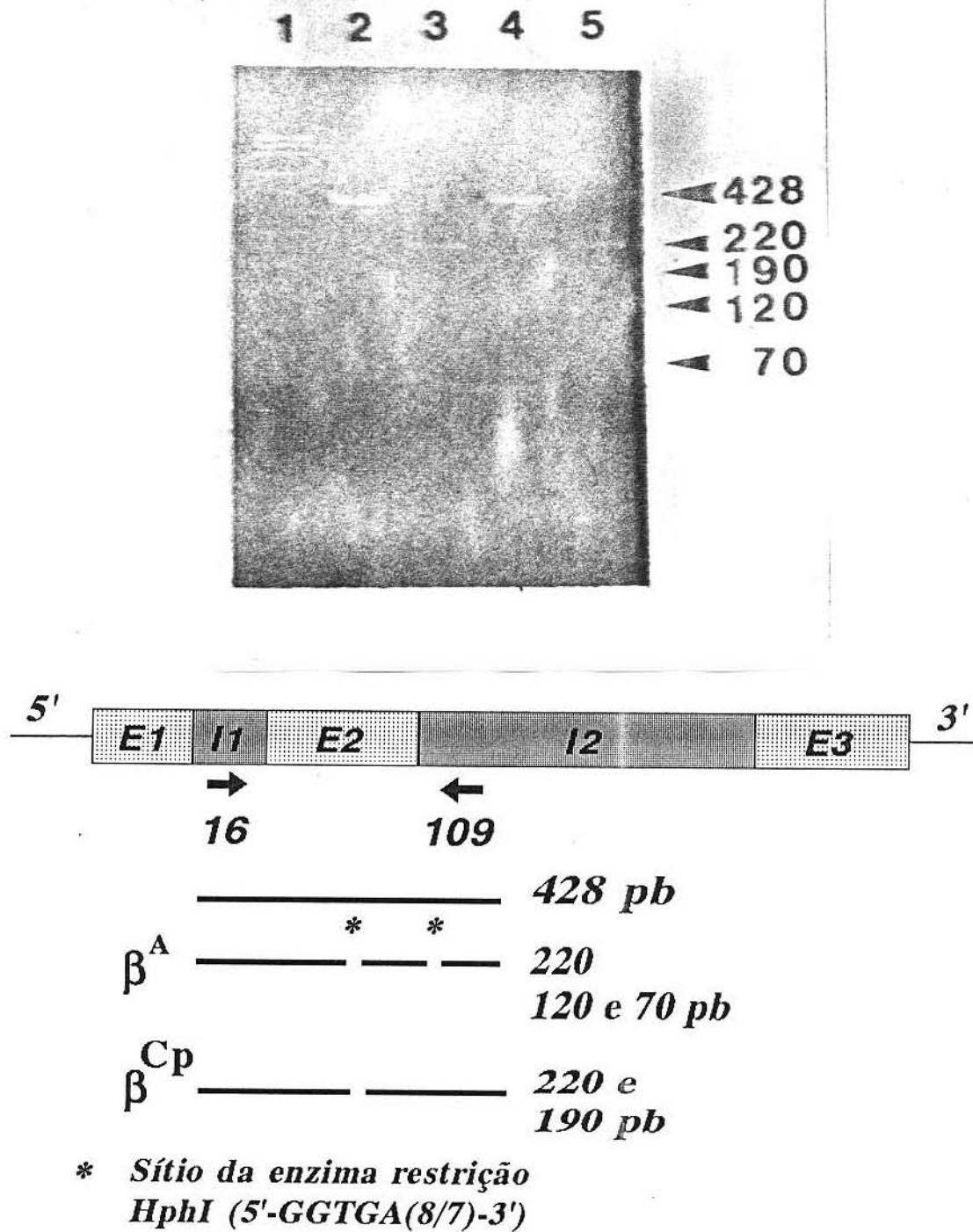


Figura 19. Acima: eletroforese em agarose 4% de fragmentos de DNA genômico amplificados por PCR e digeridos com a enzima de restrição *HphI* (1. Marcador ϕ X174 *HaeIII*, 2. fragmento amplificado de DNA controle e não digerido, 3. digestão do DNA controle amplificado e digerido, 4. fragmento amplificado do DNA da paciente e não digerido, 5. digestão do DNA da paciente amplificado e digerido. Abaixo: representação esquemática do gene da globina β , demonstrando a posição dos "primers" utilizados, bem como os fragmentos de PCR e digestão.

Família 5

Dados hematológicos:

Os dados laboratoriais das pacientes e seus pais encontram-se na Tabela VIII.

Tabela VIII. Dados laboratoriais das pacientes e familiares:

	Hb (g/dl)	Ht (%)	GV ($\times 10^{12}/l$)	VCM (fl)	HCM (pg)	HbF (%)	HbA ₂ (%)	Eletroforese de Hb	Solubilidade (%)
Paciente 1	11,1	35	5,3	66,2	21,0	2,1	2,2	A ₂ + A + X (9%)	81,6
Paciente 2	10,7	32	5,1	62,8	21,1	1,8	1,9	A ₂ + A + X (8,7%)	80,8
Mãe	12,2	36	5,4	67,7	22,6	1,1	2,1	A ₂ + A + X (7,6)	79,3
Pai	14,6	40	4,6	88,2	32,0	0,3	2,5	A ₂ + A	81,3

Eletroforese de hemoglobina:

A análise de hemoglobina revelou que aproximadamente 10% da hemoglobina era anormal e possuía padrão eletroforético compatível com Hb-Lepore, ou seja, um padrão semelhante ao da Hb S com solubilidade normal e em proporções próximas de 10%. A migração no gel de agar foi semelhante ao padrão da Hb A.

Em seu conjunto, os dados hematimétricos, com microcitose e hipocromia, aliados ao padrão eletroforético sugeriram a possibilidade da hemoglobina Lepore.

Deteção da anormalidade molecular:

A fim de identificar esta variante, o gene híbrido δ - β foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) empregando um "primer sense" 303, complementar à região 5' do gene da globina δ (5'-GGACCAGCATAAAAGGCAG-3', localizado na posição -39, com relação ao sítio Cap) e um "primer antisense" 109, complementar à região 3' do gene da globina β (5'-CCCTTCTTCCTATGACATGAACTTAACCAT-3', localizado na posição +521, com relação ao sítio Cap). As localizações dos "primers" utilizados encontram-se representadas na Figura 19. A reação produziu um fragmento de 605 pares de bases somente nas amostras de DNA genômico de portadores da hemoglobina anômala, e não nos indivíduos controle.

O sequenciamento direto do DNA das pacientes demonstrou uma seqüência correspondente ao gene da globina δ até o "codon" 68, enquanto a primeira base específica do gene da globina β foi observada no codon 86 do segundo "exon" (Figura 20). Estes dados demonstram que a mutação é do tipo Hb Lepore Baltimore, pois o resíduo de aminoácido correspondente ao "codon" δ 50 é Serina e ao "codon" β 86 é Alanina, conforme dados da literatura. Os dados de seqüência de nucleotídeos indicam que o ponto de ocorrência de "crossing-over" na Hb Lepore Baltimore, nos pacientes estudados, encontra-se dentro de uma região de 51 pares de bases no segundo "exon", entre os "codons" δ 68 e β 86.

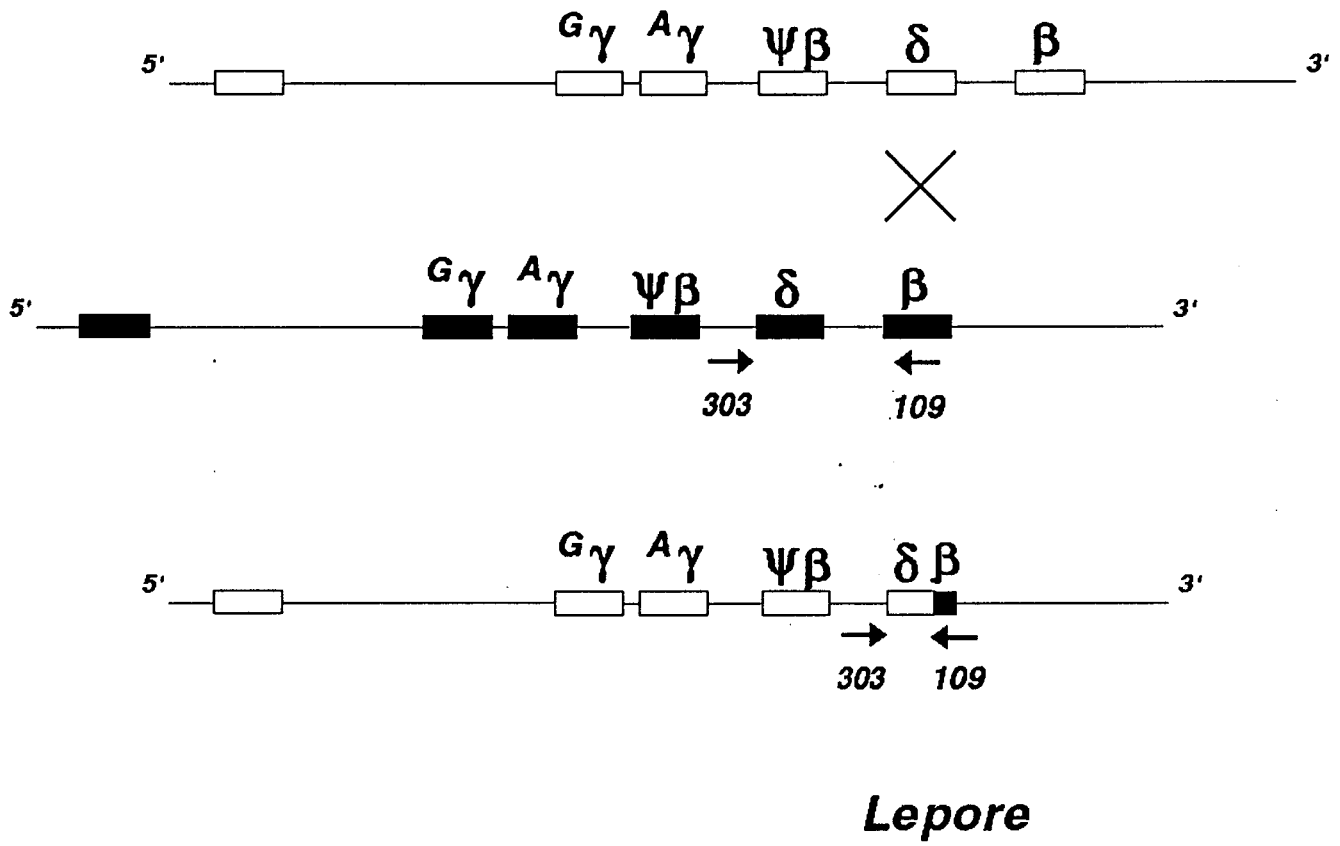


Figura 19. Localização dos "primers" utilizados na amplificação e sequenciamento do gene híbrido δ - β . Em condições normais de PCR, somente o gene híbrido é amplificado.

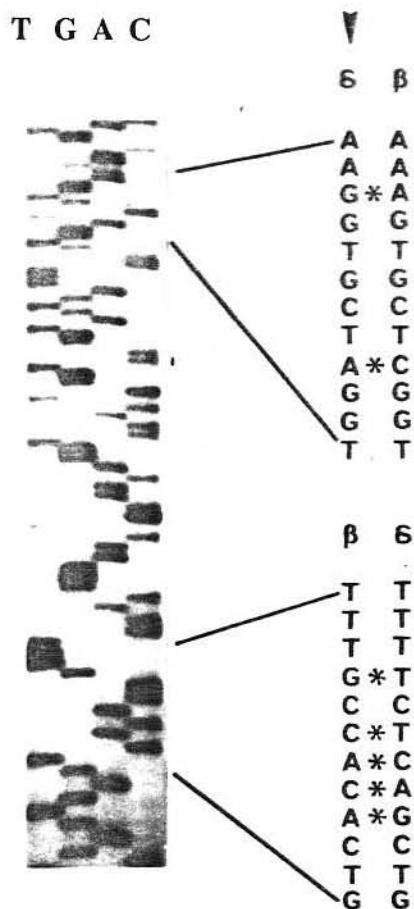


Figura 20. A seta indica a seqüência observada no paciente. A seqüência da direita indica as regiões dos genes β e δ correspondentes às regiões sequenciadas no paciente, com as indicações das posições onde não há homologia (asteriscos). Esta figura mostra que o ponto de quebra deve estar situado entre os "codons" δ 68 e β 86, conforme a anterior.

Determinação dos haplótipos do complexo da globina β :

Os dois membros da família, em cujas amostras de DNA foi realizada a análise de haplótipos, eram homozigotos em 5 sítios de restrição. Assim os haplótipos do cromossomo Lepore nas pacientes puderam ser caracterizados como: [XmnI +/- , HindIII -/- , HindIII -/- , HincII +/- , HincII -/- , HinfI -/- , HpaI +/+], isto é:

- A amplificação com os "primers" A350 e A351 gera um fragmento de 650 pb, referente à extremidade 5' do gene G_{γ} . Após a digestão deste fragmento com a enzima XmnI foram observados 3 fragmentos, os correspondentes aos produtos de digestão, com 450 e 200 pares de bases (pb) e o fragmento intacto, com 650 pb. Isto demonstra que somente um dos cromossomos apresenta o sítio de clivagem desta enzima de restrição (resultado +) e o outro não (resultado -).

- A amplificação com os "primers" H2 e H3 gera um fragmento de 780 pb, referente à região de G_{γ} . Após a digestão com a enzima HindIII foi observado somente o fragmento intacto, com 780 pb, e não os dois fragmentos de 430 e 340 pb que corresponderiam ao produto da digestão. Isto demonstra que ambos os cromossomos não possuem o sítio de clivagem desta enzima (resultado -/-).

- A amplificação com os "primers" H3 e H4 gera um fragmento de 760 pb, referente à região de A_{γ} . Após a digestão com a enzima HindIII foi observado o fragmento intacto, com 760 pb, e não os fragmentos com 400 e 360 pb, correspondentes aos produtos de digestão. Isto demonstra que ambos os cromossomos não apresentam o sítio de clivagem desta enzima (resultado -/-).

- A amplificação com os "primers" H5 e H6 gera um fragmento de 700 pb à região do gene $\Psi\beta$. Após a digestão deste fragmento com a enzima HincII foram observados 3 fragmentos, os correspondentes aos produtos de digestão, com 360 e 340 pb e o fragmento intacto, com 700 pb. Isto demonstra que somente um dos cromossomos apresenta o sítio de clivagem desta enzima (resultado +) e o outro não (resultado -).

- A amplificação com os "primers" H7 e H8 gera um fragmento de 590 pb, referente à extremidade 3' do gene $\Psi\beta$. Após a digestão com a enzima HincII foi observado

o fragmento intacto, com 590 pb, e não os fragmentos com 470 e 120 pb, correspondentes aos produtos de digestão. Isto demonstra que ambos os cromossomos não apresentam o sítio de clivagem desta enzima (resultado -/-).

- A amplificação com os "primers" H9 e H10 gera um fragmento de 620 pb, referente à extremidade 5' do gene β . Após a digestão com a enzima HinfI foi observado o fragmento intacto, com 620 pb, e não os fragmentos com 460 e 160 pb, correspondentes aos produtos de digestão. Isto demonstra que ambos os cromossomos não apresentam o sítio de clivagem desta enzima (resultado -/-).

- A amplificação com os "primers" H11 e H12 gera um fragmento de 620 pb, referente à extremidade 3' do gene β . Após a digestão deste fragmento com a enzima HpaI foram observados somente os dois fragmentos correspondentes aos produtos da digestão, com 460 e 160 pb. Isto demonstra que ambos os cromossomos possuem o sítio de clivagem desta enzima (resultado +/+).

Identificação de variantes estruturais pelo sequenciamento de RNAm extraído de reticulócitos de sangue periférico:

Com o objetivo de tornar mais rápida a identificação de hemoglobinas anômalas foi realizado o sequenciamento de RNAm obtido de reticulócitos de sangue periférico. O procedimento para extração do RNA mostrou-se eficiente e com bom rendimento. A síntese do cDNA pela transcriptase reversa e posterior amplificação pela reação em cadeia da polimerase possibilitou a obtenção de um fragmento de 592 pares de bases (Figura 21). O sequenciamento deste fragmento foi feito utilizando os mesmos "primers" da amplificação.

O par de "primers" utilizado na amplificação do cDNA foi desenhado com a finalidade de amplificar os três "exons" do gene da globina β e abrange parte do RNAm transcrito mas não traduzido. O "primer antisense" $\beta 2$ (5'-TCCAGATGCTCAAGGCCCTTC-3'), localiza-se na posição +1556 com relação ao sítio Cap e foi também utilizado na síntese do cDNA. O "primer sense" $\beta 1$ (5'-TTTGCTTCTGACACA ACTGT-3'), localiza-se na posição +2 com relação ao sítio Cap (Tabela II, Figura 7).

Essa técnica foi inicialmente utilizada na análise de anormalidades moleculares em algumas variantes comuns ou já previamente identificadas em nosso laboratório: Hb S ($\beta 6$), Hb Porto Alegre ($\beta 9$) e Hb Santa Ana ($\beta 88$) (Figuras 23 a 25). A descrição pormenorizada dos casos da Hb Porto Alegre e Hb Santa Ana deverá ser feita posteriormente (Gonçalves e colaboradores, dados em publicação).

Com os "primers" descritos foi possível realizar o sequenciamento de toda a região codificadora do gene com apenas duas reações de sequenciamento. A Figura 22 exemplifica um sequenciamento realizado com o "primer" $\beta 1$. Observa-se que é possível determinarmos a sequência de nucleotídeos até 300 pares de bases após o início do "primer". Assim, após o rastreamento inicial e identificação da mutação, esta pode ser confirmada pelo sequenciamento com um "primer" interno (Figura 25) ou por digestão com enzimas de restrição ou hibridização alelo-específica.

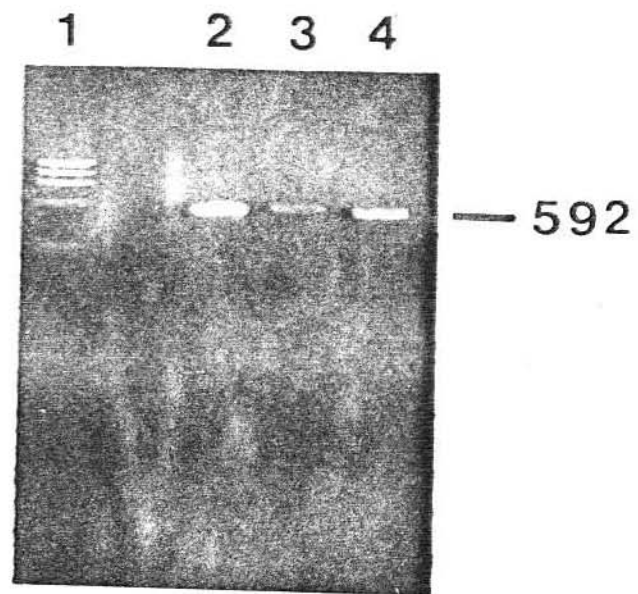


Figura 21. Eletroforese em agarose 1,5% de fragmentos de cDNA amplificados por PCR com os "primers" $\beta 1$ e $\beta 2$. 1. $\phi X174$ HaeIII, marcador; 2. 3. 4. produtos de amplificação com 592 pares de bases.

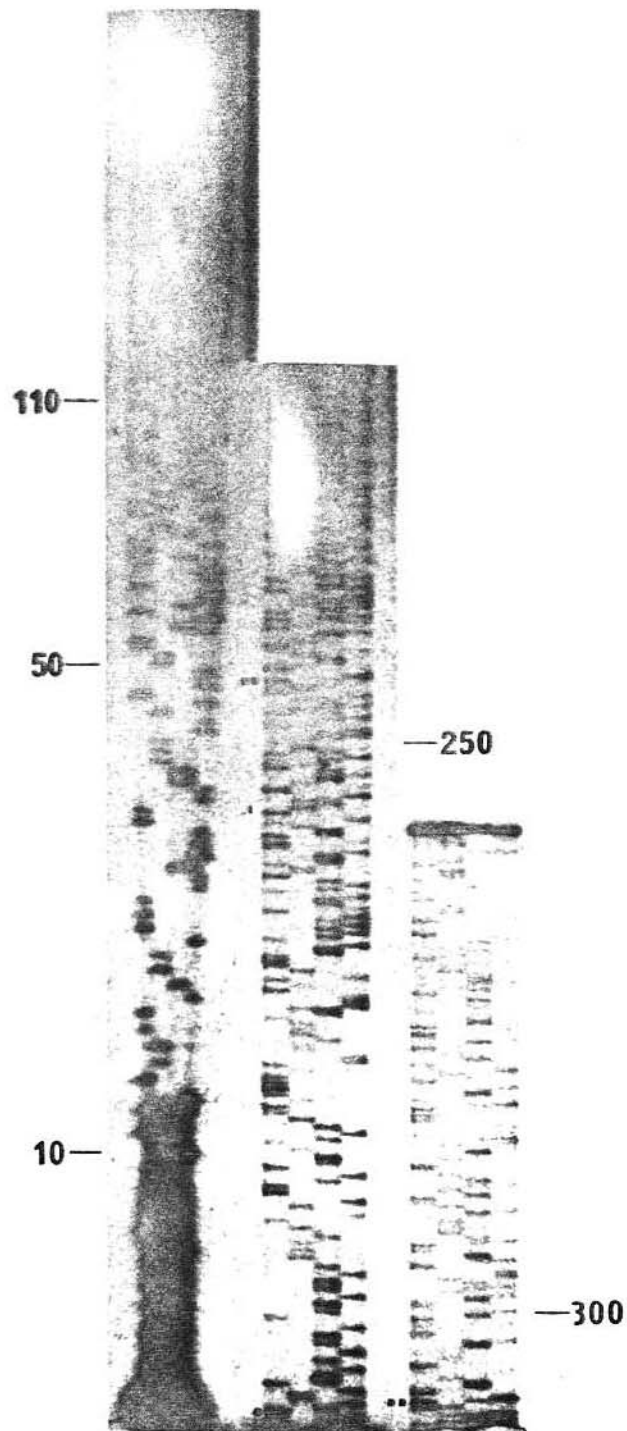


Figura 22. Autorradiografia do gel de sequenciamento realizado com o "primer" $\beta 1$ (PCR de cDNA amplificado com os "primers" $\beta 1$ e $\beta 2$). Observar que é possível determinar a sequência de nucleotídeos de até 300 pb, isto é, metade do cDNA da globina β . Portanto, com apenas duas reações é possível sequenciar toda a região codificadora.

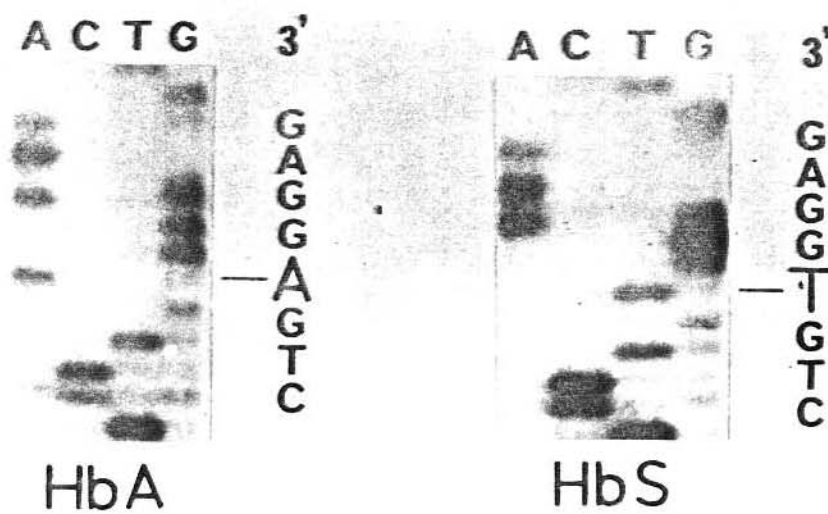


Figura 23. Sequenciamentos dos fragmentos de DNA de portadores de Hb A (normal) e Hb S, amplificados com os "primers" $\beta 1$ e $\beta 2$ e sequenciado com o "primer" $\beta 1$. A substituição de GAG - GTG no "codon" 6 do gene da globina β , que resulta na alteração do aminoácido Ácido Glutâmico para Valina encontra-se representada.

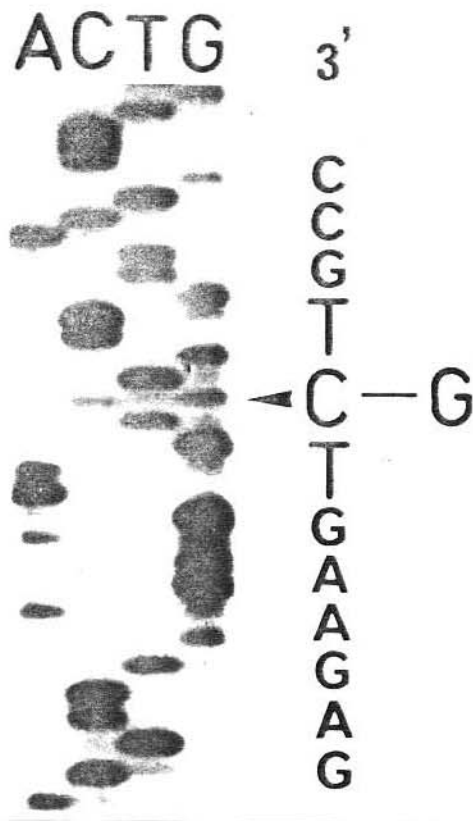


Figura 24. Sequenciamento do fragmento de DNA de portador de Hb Porto Alegre, amplificado com os "primers" $\beta 1$ e $\beta 2$ e sequenciado com o "primer" $\beta 1$. A substituição de TCT - TGT no "codon" 9 do gene da globina β , que resulta na alteração do aminoácido Serina para Cisteína encontra-se representada.

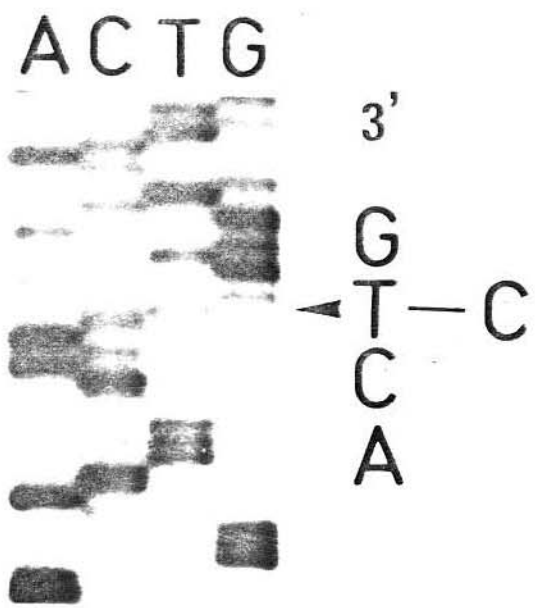


Figura 25. Sequenciamento do fragmento de DNA de portador de Hb Santa Ana, amplificado com os "primers" $\beta 1$ e $\beta 2$ e sequenciado com o "primer" 58. A substituição de CCG - GTG no "codon" 88 do gene da globina β , que resulta na alteração do aminoácido Leucina para Valina encontra-se representada.

Síndromes Talassêmicas β

Os experimentos iniciais foram conduzidos com o objetivo de padronizar o método de sequenciamento para reconhecer mutações gênicas pouco frequentes. Assim, foram estudados pacientes portadores de mutações previamente detectadas em nosso laboratório pelo método de hibridização com sondas alelo específicas (ASO) (Martins, 1993).

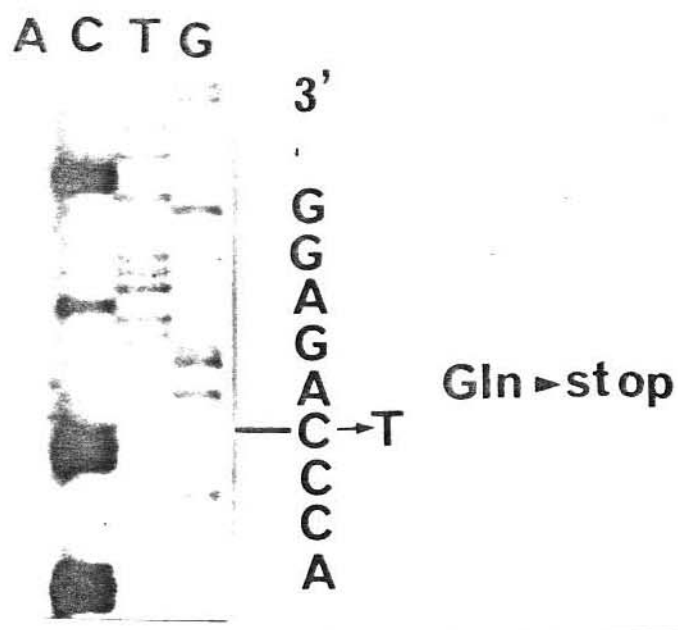


Figura 26. Sequenciamento do fragmento de DNA de portador de talassemia β 39, amplificado com os "primers" 16 e 109 e sequenciado com o "primer" P3. A substituição de CAG - TAG no "codon" 39 do gene da globina β resulta na alteração do "codon" que codifica o aminoácido Glutamina por um "codon" de terminação ("stop codon").

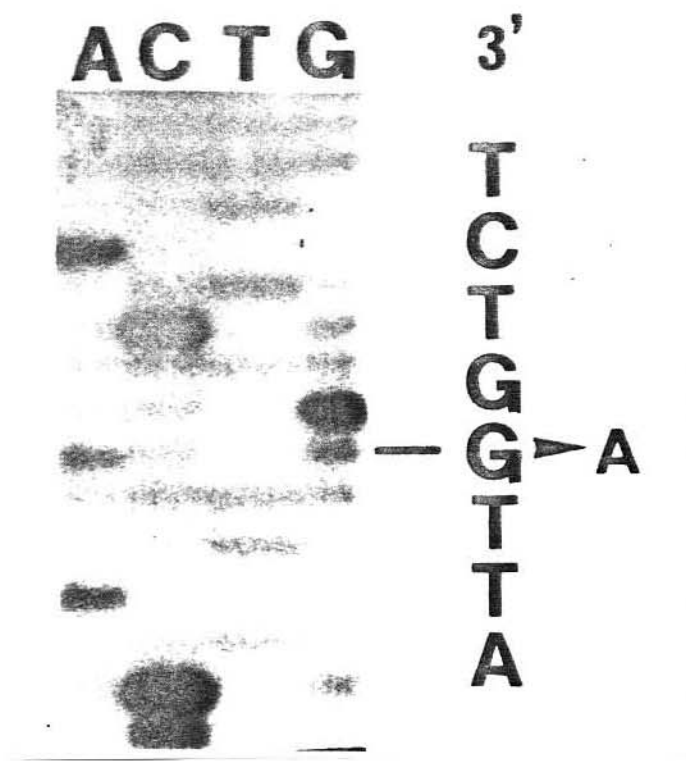


Figura 27. Sequenciamento do fragmento de DNA de portador de talassemia β IVS1-110, amplificado com os "primers" β 1 e 109 e sequenciado com o "primer" 16. A substituição de G - A na posição 110 do "intron" 1 do gene da globina β encontra-se representada.

DISCUSSÃO

Algumas das mais freqüentes variantes estruturais de hemoglobina, como por exemplo, a Hb S e a Hb C, podem ser identificadas através de métodos eletroforéticos simples e teste de solubilidade em tampão fosfato de alta concentração. Entretanto, para a identificação de variantes menos freqüentes os procedimentos envolvendo os diferentes tipos de eletroforese não são suficientes. Nesses casos, em geral, são necessários o isolamento da cadeia da globina anômala, separação em cromatografia líquida de alta resolução dos peptídeos dessa cadeia digerida com tripsina e análise de aminoácidos das frações anormais. Esse tipo de análise é complexo, consome considerável tempo em sua realização e requer equipamentos dispendiosos. Além disso, nos casos de hemoglobinas variantes extremamente instáveis, não existe hemoglobina anômala disponível para esse tipo de análise.

Outra abordagem para a caracterização de hemoglobinas anormais seria a análise molecular com o emprego de amostras de DNA ou RNA. Algumas hemoglobinas variantes podem ser identificadas por digestão com endonucleases de restrição, pois essas mutações abolem ou criam sítios de reconhecimento destas enzimas. A amplificação do gene pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e a hibridização com oligonucleotídeos alelo-específicos (ASO) também podem ser aplicadas para detectar uma mutação que, entretanto, deve necessariamente ser previamente conhecida. Assim, este método não é útil na caracterização de mutações desconhecidas. Nestes casos, a única abordagem possível está baseada em métodos que conduzem ao sequenciamento dos genes envolvidos.

Nos casos discutidos a seguir, a caracterização das hemoglobinas anormais foi levada a efeito pelo sequenciamento de DNA e posteriormente confirmada por digestão com enzimas de restrição ou hibridização alelo-específica.

Família 1

Este caso representa o segundo evento com comprovação por análise de aminoácidos ou molecular da associação de HbS/HbD descrito no Brasil. Neste paciente, assim como na família previamente descrita (Zago & Costa, 1988), pode-se presumir uma origem Africana para o gene da HbD-Punjab (β 121 Glu - Gln), pois os pais da paciente eram negros. Em apoio a esta hipótese, a prevalência da HbD em negros norte-americanos foi estimada em 0,1 a 0,4% (Bunn & Forget, 1986). De fato, vários casos esporádicos de HbD foram descritos no Brasil e é possível que a associação HbS/HbD seja mais frequente que sugerido pelos relatos da literatura (Zago & Costa, 1988; Naoum *et al.*, 1993). Dessa forma, o procedimento aqui relatado fornece um meio rápido e preciso de identificação deste tipo de associação.

Nessa família foi possível caracterizar a associação HbS/HbD pelo sequenciamento direto (em ambas as direções: 5'-3' e 3'-5') de fragmento amplificado e pela digestão deste fragmento com a enzima EcoRI. Embora, esse último procedimento seja rápido e simples, podendo ser aplicado no reconhecimento de casos sugestivos deste tipo de associação, deve ser lembrado que as variantes Hb Beograd (β 121 Glu-Val) e HbD-Arab (β 121 Glu-Lys) são resultado de substituição de aminoácido na mesma posição que aquela observada na HbD (Bunn & Forget, 1986). Portanto, apresenta alterações de nucleotídeos no mesmo "codon" 121, interferindo dessa maneira no local de reconhecimento da enzima EcoRI. Entretanto, pelo fato dessas hemoglobinas serem extremamente raras quando comparadas à frequência da HbD-Punjab, em geral não é necessária a realização de sequenciamento de DNA ou hibridização com sonda alelo específica com intuito de confirmar cada caso, podendo ser utilizada apenas a PCR e digestão com EcoRI. O resultado assim obtido, aliado ao padrão eletroforético permite identificar a HbD. Em conclusão, sugerimos que este procedimento seja adotado rotineiramente em casos suspeitos de associação HbS/HbD ou heterozigotos para HbD.

Família 2

As hemoglobinas instáveis são muitas vezes de difícil caracterização por meio de análise proteica. Muitas podem não ser detectadas através dos métodos eletroforéticos disponíveis, apesar de apresentarem carga molecular alterada. Adicionalmente, os testes de estabilidade podem fornecer resultados falso negativos. Além disso, a caracterização estrutural das seqüências peptídicas depende da quantidade de hemoglobina anormal disponível para análise e portanto do grau de instabilidade apresentado pela variante. Variantes altamente instáveis da globina β freqüentemente não são detectáveis em eritrócitos do sangue periférico, embora sejam sintetizadas em ritmo normal.

O reconhecimento do estado heterozigoto da Hb Zürich, sob condições normais, pode ser extremamente difícil. Não existem características morfológicas específicas nos eritrócitos, pode existir ligeira reticulocitose e o nível de haptoglobina sérica pode estar moderadamente reduzido. Freqüentemente, a detecção desta condição acontece em episódios de anemia hemolítica grave após terapia com derivados de sulfonamidas. São observados então grandes precipitados de hemoglobina desnaturada nos eritrócitos, metahemoglobina, hemoglobinúria e hemoglobinemia e, muitas vezes, são necessárias transfusões sangüíneas devido à gravidade da anemia.

O estado homozigoto para Hb Zürich ainda não foi descrito. Duas características da hemoglobina anormal sugerem que o estado homozigoto pode não ser viável: (1) grande instabilidade da molécula quando exposta ao calor ou oxidantes; (2) aumento da afinidade da molécula pelo oxigênio (Dickerman *et al.*, 1973). Por estas razões, indivíduos homozigotos podem não sobreviver à transição da síntese da cadeia γ para β que tem início na vida intra-uterina e continua durante os primeiros meses de vida.

A família descrita neste trabalho representa o primeiro relato de Hb Zürich na América do Sul (Zago *et al.*, 1988). A descrição original da Hb Zürich foi feita em paciente suíço (Hitzig *et al.*, 1960) e posteriormente outro caso foi descrito no estado de Maryland nos Estados Unidos (Zinkhan *et al.*, 1963). Nesses casos, como na paciente aqui estudada (de origem portuguesa), episódios de hemólise foram desencadeados pela ingestão de drogas oxidantes (derivados de sulfonamidas). É interessante observar que um dos

familiares aqui analisados apresentou hemólise aguda após ingestão de salsichas. É possível que algum dos componentes utilizados na fabricação deste alimento possa ter atuado como agente oxidante.

Duas outras variantes de hemoglobina raras, Hb M-Saskatoon ($\beta 63$ His - Tyr) e Hb Bicetre ($\beta 63$ His - Pro) (Bunn & Forget, 1986), também podem ser detectadas pela digestão com a enzima NlaIII, como resultado da mudança no mesmo "codon". Entretanto, a identificação da variante Zürich foi rapidamente conduzida pela análise molecular. O sequenciamento direto do fragmento gênico contendo o "exon" 2 mostrou a mutação esperada (A - G) na segunda posição do "codon" 63. O sequenciamento direto do fragmento foi realizado em ambas as direções (5'-3' e 3'-5'). Adicionalmente, foi possível identificar essa mutação em outros familiares pela digestão dos fragmentos amplificados com a enzima NlaIII. Esse fato reveste-se de importância porque fornece um método rápido e preciso de identificação dessa hemoglobina anômala.

Em seu conjunto, os dados obtidos nesta família permitiram desenvolver uma técnica simples de identificação de hemoglobinas instáveis pelo sequenciamento de DNA e um procedimento rápido para a caracterização da Hb Zürich pela digestão com a enzima NlaIII.

Família 3

A Hb Köln é a mais freqüente das hemoglobinas instáveis. No entanto, esta hemoglobina possui poucas características que permitem distinguí-la de outras hemoglobinas instáveis, a não ser que seja realizada análise estrutural da molécula da hemoglobina. No que se refere às manifestações clínicas observa-se anemia moderada, icterícia e excreção persistente de urina escura (Fairbanks *et al.*, 1969). A esplenectomia reduz o grau de anemia e melhora o quadro clínico dos pacientes (Scott *et al.*, 1960; Vaughan *et al.*, 1967).

O mecanismo pelo qual pode-se compreender como a substituição do aminoácido conduz à instabilidade desta hemoglobina sugere que a Valina presente na cadeia β normal está em íntimo contato com a molécula heme. Uma mudança na configuração estérica da cadeia da globina β neste ponto, devido à substituição da Valina pela Metionina (posição FG5), com sua cadeia lateral maior, pode alterar a facilidade com que ocorre a redução enzimática do ferro ou resultar em um aumento da taxa de conversão da metahemoglobina em hemoglobina desnaturada (Harley & Mauer, 1961).

Foi demonstrado que quando a Hb Köln encontra-se na conformação oxigenada, a molécula está saturada com grupos heme, e portanto, estável. A transição para o estado oxigenado resulta na perda do grupo heme da cadeia β , subsequente instabilidade, precipitação e formação de corpúsculos de Heinz. Os corpúsculos de Heinz são agregados de produtos de degradação citoplasmáticos que se ligam à membrana celular. Esses produtos de degradação são constituídos basicamente de globina desnaturada e hemicromos (grupos heme, cujo ferro está covalentemente ligado à proteína).

No Brasil foram descritos alguns casos de Hb Köln identificados pela análise proteica (Naoum *et al.*, 1993). Em nosso trabalho a identificação dessa variante foi levada a efeito pelo sequenciamento de DNA (em ambas as direções: 5'-3' e 3'-5'), o que permitiu, como no caso da Hb Zürich, rápida caracterização da Hb anômala.

Para confirmar esse achado e desenvolver um procedimento mais simples para detectar a Hb Köln a técnica empregada foi a hibridização com oligonucleotídeos alelo-específicos. A escolha deste método decorre da inexistência de um sítio de restrição

conhecido na posição onde ocorre esta mutação. Assim, naqueles casos em que os dados clínicos e o padrão hematológico e eletroforético sugerem Hb Köln, a confirmação dessa variante pode ser conduzida por este procedimento, evitando a tediosa análise protéica (Rahbar *et al.*, 1991; Wajcman *et al.*, 1991a e b).

Família 4.

A posição G6 é ocupada, em todas as cadeias de hemoglobina conhecidas por Lisina ou Arginina, indicando que este resíduo tem um papel importante na estrutura tetramérica da hemoglobina. De acordo com o modelo de Perutz (1987), a cadeia lateral do resíduo G6 se estende para o interior da cavidade da molécula da globina. Sua carga positiva ajuda a definir a natureza hidrofílica da cavidade e contribui para estabilidade pela formação de uma ponte iônica com um Ácido Glutâmico vizinho. Desse modo, o resíduo desta posição contribui para a estabilidade do tetrâmero da hemoglobina, e não é surpreendente que a Hb Camperdown (β 104 Arg - Ser) demonstre um decréscimo de sua estabilidade. Assim, a Hb Camperdown também é considerada uma hemoglobina instável. Não obstante, os portadores dessa variante não apresentam alterações clínicas significativas.

A paciente descrita neste trabalho representa o primeiro caso de Hb Camperdown descrito no Brasil, além de ser o único em que foi conduzida a análise molecular. A identificação dessa variante foi consequência de análise molecular. Como não foi possível obter um padrão eletroforético sugestivo de hemoglobinas anormais conhecidas, o método de rastreamento para localizar a região da mutação foi o SSCP.

O progresso técnico na determinação de seqüências de DNA tem resultado em uma enorme quantidade de dados que permitem não só responder questões biológicas, mas também apresentam potencial para utilização clínica no diagnóstico de neoplasias e anomalias hereditárias, principalmente as caracterizadas por mutações de ponto. Até recentemente, estes dados eram provenientes de técnicas de clonagem, sequenciamento e análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) por Southern blot (Botstein *et al.*, 1980). Com o advento da PCR, um novo caminho foi encontrado na detecção dessas mutações. Neste contexto, Orita e colaboradores (1989a e b), simplificando a técnica de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) (Fisher & Lerman, 1983; Myers *et al.*, 1985 a, b, c; Myers & Maniatis, 1986), desenvolveram a análise de polimorfismo de conformação em hélice simples pela reação em cadeia da polimerase (PCR-SSCP), a qual figura como uma técnica simples, rápida e satisfatória na detecção de mutações. Nela a seqüência em estudo é marcada com radioatividade, simultaneamente à sua amplificação pela PCR. O produto amplificado é então desnaturado e submetido a

eletroforese em gel de poliacrilamida. As mutações são observadas na autorradiografia como bandas separadas por mobilidade alterada. Posteriormente, a mutação pode ser caracterizada através de sequenciamento (Orita *et al.*, 1989 a e b; Murakami *et al.*, 1991).

O princípio deste método consiste no fato de que a mobilidade eletroforética de uma partícula em um gel é dependente de sua forma e tamanho. Em condições não desnaturantes, DNA em fita simples possui uma conformação estrutural determinada por interações intramoleculares e por sua seqüência. A análise por SSCP detecta a seqüência mutante como uma mudança na mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida (dado ao alto poder de resolução deste tipo de gel) causada pela alteração da conformação estrutural (Hayashi, 1991).

Embora esta análise seja relativamente nova, e somente um limitado número de resultados publicados estejam disponíveis, já podemos citar alguns exemplos de sua aplicabilidade na investigação de várias mutações somáticas das famílias do oncogene RAS (Suzuki *et al.*, 1990); gene p53 (Murakami *et al.*, 1991); gene responsável pelo retinoblastoma (Murakami *et al.*, 1991); na detecção de polimorfismos de DNA, como no gene receptor de dopamina D2, refutando a associação deste gene com o alcoolismo (Bolos *et al.*, 1990); ou ainda na caracterização de várias mutações novas: no gene regulador da condutância transmembrana (CFTR), responsável pela fibrose cística (Dean *et al.*, 1990; Iannuzzi *et al.*, 1991); no gene responsável pela neurofibromatose tipo 1 (Cawthon *et al.*, 1990); no gene da variante B1 da doença de Tay-Sachs (Ainsworth *et al.*, 1991); no gene do fator IX da coagulação (Demers *et al.*, 1990); no gene da deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (Calabrò *et al.*, 1993) e no rastreamento de alelos da talassemia β (Nozari & Rahbar, 1991).

Ao lado de técnicas como o ARMS (amplification refractory mutation system) (Weatherall, 1991), o AMD (amplification and mismatch detection) (Sheffield *et al.*, 1989), o CCM (chemical cleavage mismatch), o TGGE (temperature gradient gel electrophoresis) (Nozari & Rahbar, 1991) e o DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), a SSCP baseia-se no princípio da não complementaridade em uma ou poucas bases para fornecer dados no rastreamento de mutações de ponto ou pequenas deleções ou inserções no DNA genômico. A principal vantagem do método de DGGE é a ausência de isótopos radioativos,

no entanto, a necessidade da utilização de "primer" com longas seqüências GC ("GC clamp") o torna, em geral, demasiadamente dispendioso para uso rotineiro.

No caso aqui estudado a técnica de SSCP foi capaz de reconhecer, com clareza, a região da mutação que foi posteriormente identificada pelo sequenciamento de DNA (em ambas as direções: 5'-3' e 3'-5'). Foi possível também, reconhecer o padrão anormal na Hb Zürich já anteriormente caracterizado por sequenciamento. Desse modo, o método de SSCP se apresenta como um excelente procedimento para rastreamento inicial das mutações nas hemoglobinas anormais. Além disso, foi possível desenvolver um procedimento para reconhecer a mutação pela digestão do fragmento amplificado com a enzima HphI.

Paciente 5

O estado heterozigoto para as variantes de hemoglobina do tipo Lepore apresenta características clínicas e hematológicas semelhantes à talassemia β heterozigótica, enquanto os homozigotos apresentam forma grave de anemia, associada à ausência de síntese de cadeias β (Bunn & Forget, 1986).

Esta hemoglobina anormal foi previamente identificada por análise peptídica, a qual não permite reconhecimento preciso da região do "crossing over" ao nível de DNA. Estudos de mapeamento gênico dos três tipos de hemoglobina Lepore permitiram estreitar a região envolvida na recombinação, mas somente dados de sequenciamento de DNA podem fornecer informações precisas referentes ao ponto de quebra (Metzenberg *et al.*, 1991).

Nas pacientes aqui estudadas o tamanho do fragmento obtido na reação de PCR (605 pares de bases) comprova a presença do gene mutante híbrido, resultado da fusão da porção 5' do gene da globina δ e a porção 3' do gene da globina β . Uma vez que esses genes encontram-se separados por cerca de 7 kilobases, somente o gene híbrido é amplificado em uma reação normal.

Os dados de sequenciamento indicam primeiro que a variante é a Hb Lepore Baltimore e que o ponto de quebra no "crossing over" está situado em uma região de 51 pares de bases no segundo "exon". Nesta região, os genes δ e β (que deram origem ao híbrido) são idênticos, como previamente reportado por Metzenberg e colaboradores (1991). O ponto de quebra no "crossing over" das Hb Lepore-Boston e Lepore-Hollandia estão em diferentes regiões de 58 e 40 pares de bases, respectivamente, onde os genes δ e β também são idênticos.

Com o objetivo de comparar essa família, possuidora de Hb Lepore Baltimore, com aquelas previamente descritas na literatura foram conduzidos estudos para determinação dos haplótipos do complexo de genes β nessas pacientes. Em contraste com as seqüências codificadoras de RNAm, as quais demonstram pouca ou nenhuma variabilidade entre indivíduos, as regiões intergenes e os "introns" podem variar significativamente de uma pessoa para outra. Este fato é explicado provavelmente pela

ausência de regiões funcionais no DNA extragênico, sem conseqüências negativas devido à seleção natural.

A geração de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos fornece evidência de variabilidade na região testada, chamada polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição. Existem duas causas para este polimorfismo: substituição de base dentro da seqüência de reconhecimento da endonuclease de restrição, e variação no comprimento do DNA presente em diferentes indivíduos entre dois sítios de restrição consecutivos.

Estes polimorfismos não ocorrem em associação a outros de maneira totalmente casual. Assim, combinações específicas ou grupos de polimorfismos, chamados haplótipos, foram identificados em alta freqüência em diferentes populações. A análise de haplótipos tem sido muito útil no estudo genético das anomalias hereditárias que afetam os genes da globina. Em particular, o estabelecimento de relação entre um dado haplótipo e um gene para talassemia β pode resultar em diagnóstico pré-natal por análise de DNA obtido por amniocentese ou biópsia de vilosidades coriônicas. Análise de haplótipos tem também facilitado estudos da base molecular da talassemia β , identificando indivíduos com novas mutações e demonstrando a extraordinária heterogeneidade do gene β^S , que sugere a ocorrência de múltiplas mutações separadas como base desta desordem (Orkin & Kazazian, 1984).

Estudos de haplótipos têm também sugerido uma inesperada e elevada freqüência de eventos de recombinação entre as extremidades 5' e 3' do grupo de genes não- α . Foi proposta a existência de um "hot spot" para recombinação em algum lugar entre a extremidade 5' do gene da globina δ e a extremidade 5' do gene da globina β . Essa região é possivelmente um bloco de dinucleotídeos TG repetidos no ponto médio entre os genes δ e β (Lanclos *et al.*, 1987).

Vários estudos têm demonstrado que a Hb-Lepore-Boston é a variante Lepore predominante na Itália (Camachella *et al.*, 1989; Fioretti *et al.*, 1992; Iolascon *et al.*, 1992). A Hb-Lepore-Baltimore foi descrita em uma família do norte da Sardenha, mas uma possível origem espanhola pode ter ocorrido nesta família estudada. A família estudada neste trabalho é de origem italiana, e conseqüentemente o gene anormal pode ter

possivelmente se originado na Itália. A análise de haplótipos, nas pacientes aqui estudadas, forneceu resultados diferentes daqueles reportados por Lanclos e colaboradores (1987) em cinco membros de uma família espanhola com Hb-Lepore-Baltimore. Nossos dados sugerem que, como descrito para a Hb-Lepore-Boston, mutações independentes para Hb-Lepore-Baltimore tenham também surgido em diferentes partes do mundo.

Os casos aqui descritos representam a primeira descrição da Hb-Lepore-Baltimore na América do Sul e a segunda descrição da região do ponto de quebra neste gene variante. Estas observações também enfatizam o alto grau de miscigenação racial característico da população brasileira.

Hemoglobinas Variantes Identificadas pelo Sequenciamento de RNAm (RT-PCR)

O sequenciamento dos genes da globina humana é geralmente realizado com a utilização de DNA genômico extraído de leucócitos de sangue periférico. A reação é feita após amplificação, por PCR, de parte ou de todo o gene da globina e inclui várias reações de sequenciamento com "primers" internos para completar a caracterização de cada um dos três "exons".

O sequenciamento do cDNA obtido de RNA mensageiro extraído de reticulócitos tem sido empregado principalmente para a detecção de mutações em genes longos e com muitos "exons", como acontece nos defeitos hereditários do citoesqueleto de eritrócitos e na hemofilia A (Tse *et al.*, 1991; Naylor *et al.*, 1991).

Desde que a mutação não provoca a interrupção da transcrição gênica e a proteína anormal é sintetizada, o RNAm de reticulócitos figura como um molde muito bom para sequenciamento, uma vez que somente os "exons" estão presentes. Este procedimento é ideal para a análise de genes como os descritos na parágrafo anterior.

Somente um trabalho na literatura descreve a utilização de RNAm para a identificação de hemoglobinas variantes (Liu *et al.*, 1992). Neste trabalho, descrevemos modificações no método de extração de RNA, na estratégia de sequenciamento do gene e na sua aplicação para a caracterização de globinas variantes.

Desse modo, é possível a obtenção de toda a seqüência codificadora do gene da globina β com os mesmos "primers" utilizados na amplificação. Se necessário, após a mutação ser identificada por esse rastreamento inicial, ela pode ser confirmada por sequenciamento com "primers" internos, hibridização com sondas alelo-específicas ou digestão com enzimas de restrição apropriadas.

Este procedimento apresenta vantagens sobre outros métodos previamente descritos para identificação de hemoglobinas variantes por análise protéica e de DNA. A extração de RNA é simples, rápida e não requer cloreto de cézio, cloreto de guanidina ou proteinase K. O sequenciamento direto do produto de PCR obtido por transcriptase reversa permite analisar todo o gene da globina β em apenas duas reações. Portanto, este método

deve ser útil para a identificação rápida de hemoglobinas variantes, incluindo também as mutações da globina α , sem a necessidade de se recorrer aos complexos procedimentos analíticos de química de proteínas.

A utilidade desse método foi demonstrada na identificação de duas hemoglobinas anormais extremamente raras, a Hb Porto Alegre ($\beta 9$ Ser - Cys) e a Hb Santa Ana ($\beta 88$ Leu - Val). Importa ressaltar, que a Hb Porto Alegre foi descrita, como o nome indica, pela primeira vez em indivíduo estudado em Porto Alegre no Brasil (Tondo & Salzano, 1962; Tondo *et al.*, 1973 e 1974).

Síndromes talassêmicas

Diferentemente da maioria das hemoglobinopatias estruturais, as anormalidades moleculares das talassemias β devem obrigatoriamente serem pesquisadas em DNA genômico e não em RNA. Esta afirmação advém do fato que grande parte das mutações talassêmicas origina RNAm instável e de difícil detecção em reticulócitos. Além disso, um número considerável dessas mutações ocorre em "introns".

Consoante esses dados, a análise dos pacientes talassêmicos aqui estudados foi conduzida em DNA genômico. O sequenciamento direto dos fragmentos amplificados permitiram a identificação das mutações (C - T) no "codon" 39 (CD 39) e a (G - A) na posição 110 do "intron" 1 (IVS1-110) nos pacientes em que estas anormalidades eram previamente conhecidas (Martins, 1993). No entanto, é previsível que com uma maior utilização do sequenciamento de DNA na identificação de mutações das síndromes talassêmicas, outros pacientes possam ser identificados.

Os genes da globina β podem apresentar na talassemia β , mutações que geram um "codon" de terminação ("nonsense mutation" - "stop codon") ou que alteram a leitura do gene ("frameshift mutations"). Essas mutações conduzem a uma terminação prematura da cadeia durante a tradução. Nestes casos, nenhuma globina β é produzida. Portanto, estes genes são do tipo β^0 . A mutação "nonsense" no "codon" 39 é importante porque está presente em 30% dos alelos da talassemia β entre indivíduos de origem Mediterrânea e relaciona-se a uma presença de RNAm grandemente reduzida nas células eritróides (Orkin & Kazazian, 1984).

Genes que determinam a talassemia β podem também apresentar substituições de nucleotídeos no interior de "introns". Em geral, estas mutações exercem efeitos deletérios no processamento de RNA, criando novos sítios de "splicing" nos "introns", e alterando o processamento normal. O primeiro gene deste tipo a ser caracterizado apresenta substituição de G - A no "intron" 1, posição 110 (IVS1-110). A alteração no "splicing" normal, devido a criação de um novo sítio acceptor, conduz a uma terminação prematura da tradução do RNAm. Esta mutação é do tipo β^+ , uma vez que pequena percentagem de β RNAm normal é produzido (Orkin & Kazazian, 1984).

Em seu conjunto, os resultados deste trabalho permitiram a padronização do método de sequenciamento direto de fragmentos de DNA genômico e cDNA amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) na investigação de hemoglobinopatias estruturais e talassêmicas.

CONCLUSÕES

1. O método padronizado para sequenciamento direto de fragmentos do gene da globina β , amplificados pela reação em cadeia da polimerase foi uma variação da técnica de Sanger, empregando Taq DNA polimerase e ciclos variáveis de temperatura.
2. A caracterização da Hb D (β 121) foi conduzida por sequenciamento direto do fragmento amplificado pela PCR, e o procedimento simplificado de detecção desta hemoglobina variante foi estabelecido pela digestão com a enzima EcoRI.
3. A caracterização da Hb Zürich (β 63) foi levada a efeito por sequenciamento direto do fragmento amplificado pela PCR, e o procedimento simplificado de detecção desta hemoglobina variante foi estabelecido pela digestão com a enzima NlaIII.
4. A caracterização da Hb Köln (β 98) foi feita pelo sequenciamento direto do fragmento amplificado pela PCR, e o procedimento simplificado de detecção desta hemoglobina variante foi estabelecido pela hibridização com oligonucleotídeos alelo específicos.
5. A caracterização da Hb Camperdown (β 104) foi realizada através de sequenciamento direto do fragmento amplificado pela PCR, e o procedimento simplificado de detecção desta hemoglobina variante foi estabelecido pela digestão com a enzima HphI. O método de rastreamento inicial para detecção de mutações de ponto no gene da globina β foi padronizado, nesse caso, pela análise por SSCP.

6. A caracterização da Hb Lepore Baltimore ($\delta 50\beta 86$) foi conduzida pelo sequenciamento direto do fragmento amplificado pela PCR. A análise de haplótipos dos portadores de Hb Lepore Baltimore permitiu inferir que esta variante, assim como a Hb Lepore Boston deve ter surgido como mutação independente.

7. O método de sequenciamento de cDNA, obtido a partir de RNAm extraído de reticulócitos de sangue periférico, foi estabelecido, simplificando e tornando mais rápida a identificação de variantes estruturais. Permitiu a confirmação de duas mutações em hemoglobinas raras (Hb Porto Alegre $\beta 9$ e Hb Santa Ana $\beta 88$).

RESUMO

O estudo das hemoglobinas humanas tem contribuído substancialmente para o entendimento de princípios genéticos básicos e para a aplicação de novos métodos na análise de doenças. A utilização de abordagem molecular na investigação dos genes da globina tem conduzido a um rápido progresso no entendimento de sua estrutura e função.

Neste trabalho foi levada a efeito a padronização do método de sequenciamento direto de fragmentos de DNA genômico e cDNA amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) na investigação de hemoglobinopatias estruturais e talassêmicas.

As hemoglobinas variantes: Hb D (β 121), Hb Zürich (β 63), Hb Köln (β 98), Hb Camperdown (β 104) e Hb Lepore Baltimore (δ 50 β 86), além das mutações talassêmicas: CD39 e IVS1-110 foram identificadas por sequenciamento direto, sendo que as alterações estruturais foram confirmadas por digestão com endonucleases de restrição ou hibridização alelo específica. O método de SSCP foi estabelecido para o rastreamento de mutações de ponto no gene da globina β . Foi descrito ainda, um método simples e rápido para detecção molecular de mutações estruturais do gene da globina β por sequenciamento de cDNA obtido a partir de RNAm extraído de reticulócitos de sangue periférico. Com o emprego deste procedimento foram caracterizadas duas variantes raras: Hb Porto Alegre (β 9) e Hb Santa Ana (β 88).

Em conclusão, os dados sugerem que a abordagem descrita é muito útil na detecção de variantes de hemoglobina, e deverá substituir gradativamente a complexa análise protéica na identificação de Hb anômalas.

SUMMARY

The study of human hemoglobins has contributed substantially to the understanding of basic genetic principles and to the application of new methods in the analysis of disease. The use of molecular analysis to the study of globin genes has led to rapid progress in the understanding of their structure and function.

In this work, we carried out the direct sequencing of the polymerase chain reaction amplified products from genomic DNA and cDNA and the investigation of structural and thalassemic hemoglobinopathies.

The hemoglobins: Hb D (β 121), Hb Zürich (β 63), Hb Köln (β 98), Hb Camperdown (β 104), Hb Lepore Baltimore (δ 50 β 86) and the thalassemic mutations: CD 39 and IVS1-110 were identified. The structural alterations were confirmed by digestion using restriction endonucleases or allele-specific hybridization. The SSCP analysis was established to the investigation of point mutations in the β globin gene. The Hb Lepore was studied by haplotype analysis. A simple and rapid method for the molecular detection of β -globin structural mutations was described using a reverse transcription polymerase chain reaction of reticulocyte mRNA and direct sequencing of the product. Employing this procedure were characterized two rare variants: Hb Porto Alegre (β 9) e Hb Santa Ana (β 88).

In conclusion, it is suggested that this approach should be very useful to detect hemoglobin variants, and should replace the complex procedures as protein analysis.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

- Ainsworth, P.J., Surh, L.C. & Coulter-Mackie, M.B. (1991). Diagnostic single strand conformational polymorphism, (SSCP): a simplified non-radioisotopic method as applied to a Tay-Sachs B1 variant. **Nuc l Acid Res** 19: 405.
- Baglioni, C. (1962). The fusion of two peptide chains in hemoglobin Lepore and its interpretation as a genetic deletion. **Proc Natl Acad Sci USA** 48: 1880.
- Baglioni, C. (1965). Abnormal human hemoglobins X. A study of hemoglobin Lepore Boston. **Biochim Biophys Acta** 97: 37.
- Bank, A. (1978). The thalassemia syndromes. **Blood** 51: 369.
- Bank, A., Braverman, A.S., ODonnell, J.V. & Marks, P.R. (1972). Absolute rates of globin chain synthesis in thalassemia. **Blood** 31: 226.
- Baralle, F.E., Shoulders, C.C. & Proudfoot, N.J. (1980). The primary structure of the human ϵ -globin gene. **Cell** 21: 621.
- Barnabas, J. & Muller, C.J. (1962). Haemoglobin Lepore Hollandia. **Nature** 194: 931.
- Basset, P. Beuzard, Y., Garel, M.C. & Rosa, J. (1978). Isoelectric focusing of human hemoglobin; Its application to screening, to the characterization of 70 variants, and to the study of modified fractions of normal hemoglobins. **Blood** 51: 971
- Bolos, A.M., Dean, S., Lucas-Derse, Ramsberg, M., Brown, G.L. & Goldmanm D. (1990). Population and pedigree studies reveal a lack of association between the dopamine D2 receptor gene and alcoholism. **J Am Med Assoc** 264: 3156.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. & Davis, W.D. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am J Hum Genet** 32: 314.
- Brittenham, G.M. (1987). Globin gene variants and polymorphisms in India. In: W.P. Winter (ed). **Hemoglobin variants in human populations.**, Vol. 2. CRC, Boca Raton.
- Bunn, H.F. & Forget, B.G. (1986). **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects.** W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Bunn, H.F., Noguchi, C.T., Hofrichter, J., Schechter, G.P., Schechter, A.N. & Eaton, W.A. (1982). The molecular and cellular pathogenesis of hemoglobin SC disease. **Proc Natl Acad Sci USA** 79: 7527.

- Calabrò, V., Mason, P.J., Filosa, S., Civitelli, D., Cittadella, R., Tagarelli, A., Martini, G., Brancati, C. & Luzzatto, L. (1993). Genetic heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency revealed by single-strand conformation and sequence analysis. **Am J Hum Genet** **52**: 527.
- Camachella, C., Serra, A., Bertero, M.T., Gottardi, E., Altarano, A., Revello, D., Travi, M., Seia, M., Cremonesi, L. & Ferrari, M. (1989). Molecular characterization of Italian chromosomes carrying the Lepore Boston gene. **Acta Haematol.** **81**: 136.
- Carrell, R.W., Lehmann, H. & Hutchison, H.E. (1966). Haemoglobin Köln (β 98 Valine - Methionine): an unstable protein causing inclusion body anaemia. **Nature** **210**: 915.
- Cawthon, R.M., Weiss, R., Xu, G., Viskochil, D., Culver, M., Stevens, J., Robertson, M., Dunn, D., Gesteland, R., O'Connell, P. & White, R. (1990). A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure and point mutations. **Cell** **62**: 193.
- Costa, F.F., Tavella, M.H. & Zago, M.A. (1989). Deletion type α -thalassemia among Brazilian patients with sickle cell anemia. **Rev Brasil Genet** **12**: 605.
- Curuk, M.A., Kutlar, A. & Huisman, T.H.J. (1992). Hb S Helby [α 2 β 2 131 (H9) Gln-Lys] β^0 -thalassemia [codon 15 (TGG-TGA)] identified by DNA sequence. **Hemoglobin**, **16**: 417.
- Dacie, J.V. & Lewis, S.M. (1984). **Practical Haematology**. 6^a edição, Churchill, New York.
- Dean, J. & Schechter, A.N. (1978). Sickle cell anemia : Molecular and cellular bases of therapeutic approaches. **N England J Med** **299**: 752.
- Dean, M., White, M.B., Amos, J., Gerrard, B., Stewart, C., Khaw, K.T. & Leppert, M. (1990). Multiple mutations in highly conserved residues are found in mildly affected cystic fibrosis patients. **Cell** **61**: 863.
- Deisseroth, A., Velez, R. & Nienhuis, A.W. (1976). Hemoglobin synthesis in somatic cell hybrids: Independent segregation of the human α - and β -globin genes. **Science** **191**: 1262.
- Deisseroth, A., Nienhuis, A., Turner, P., Velez, R., Anderson, W.F., Ruddle, F., Lawrence, J., Creagen, R. & Kucherlapati, R. (1977). Localization of the human α -globin structural gene to chromosome 16 in somatic cell hybrids by molecular hybridization assay. **Cell** **12**: 205.
- Deisseroth, A., Nienhuis, A., Lawrence, J., Giles, R., Turner, P. & Ruddle, F.H. (1978). Chromosomal localization of human globin gene on human chromosome 11 in somatic cell hybrids. **Proc Natl Acad Sci USA** **75**: 1456.

- Demers, D.B., Odelberg, S.J. & Fisher, L.McA. (1990). Identification of factor IX point mutation using SSCP analysis and direct sequencing. *Nuc l Acid Res* 18: 5575.
- Dickerman, J.D., Holtzman, N.A. & Zinkham, W.H. (1973). Hemoglobin Zürich. A third family with hemolytic reactions to sulfonamides. *Am J Med* 55: 638.
- Dickerson, R.E. & Geis, I. (1983). **Hemoglobin: structure, function, evolution, and pathology.** Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA.
- Dierks, P., Ooyen, A.W. & Cochran, M.D. (1983). Three regions upstream of the cap site are required for efficient and accurate transcription of the rabbit β -globin gene in mouse 3T3 cells. *Cell* 32: 695.
- Efremov, D.G., Rudovic, R., Niazi, G.A., Hunter Jr., E., Huisman, T.H.J. & Schroeder, W.A. (1976). An individual with hemoglobin-Lepore-Baltimore δ - β thalassemia in a Yugoslavian family. *Scand J Haematol* 16: 81.
- Efremov, D.G., Efremov, G.D., Zisovski, N., Stojanovski, N., Kutlar, F., Diaz-Chico, J.C., Kutlar, A., Yang, K.G., Stoming, T.A., & Huisman, T.H.J. (1988). Variation in clinical severity among patients with Hb Lepore-Boston- β -thalassaemia is related to the type of β -thalassaemia. *Brit J Haematol* 68: 351.
- Efstratiadis, A., Posakony, J.W., Maniatis, T., Lawn, R.M., O'Connell, C., Spritz, R.A., de-Riel, J.K., Forget, B.G., Weissman, S.M. Slightom, J.L., Blechl, A.E., Smithies, O., Baralle, F.E., Shouders, C.C. & Proudfoot, N.J. (1980). The structure and evolution of the human β globin gene family. *Cell* 21: 653.
- Fairbanks, V.F., Opfell, R.W. & Burgert Jr, E.O. (1969). Three families with unstable hemoglobinopathies (Köln, Olmsted and Santa Ana) causing hemolytic anemia with inclusion bodies and pigmenturia. *Am J Med* 46: 344.
- Finch, C.A. (1972). Pathophysiologic aspects of sickle cell anemia. *Am J Med* 53: 1.
- Fioretti, G., De Angioletti, M., Masciangelo, F., Lacerra, G., Scarallo, A., de Bonis, C., Pagano, L., Guarino, E., De Rosa, L., Salvati, F. & Carestia, C. (1992). Origin heterogeneity of Hb Lepore-Boston gene in Italy. *Am J Hum Genet* 50: 781.
- Fischel-Ghodsian, N., Hirsch, P.C. & Bohlman, M.C. (1990) Rapid detection of hemoglobin C mutation by allelic-specific polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 47: 1023.
- Fischer, S.G. & Lerman, L.S. (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 1579.

- Flavell, R.A., Kooter, J.W. De Boer, E., Little, P.F.R. & Williamson, R. (1978). Analysis of δ - β globin gene in normal and Hb Lepore DNA: direct determination of gene linkage and intergene distance. **Cell 15**: 25.
- Forget, B.G. (1979). Molecular genetics of human hemoglobin synthesis. **Ann Inter Med 91**: 616.
- Frick, P.G., Hitzig, W.H. & Betke, K. (1962). Hemoglobin Zürich. A new hemoglobin anomaly associated with hemolytic episodes with inclusion bodies sulfonamide therapy. **Blood 20**: 261.
- Fritch, E.F., Lawn, R.M. & Maniatis, T. (1980). Molecular cloning and characterization of the human β -like globin gene cluster. **Cell 15**: 1157.
- Fucharoen, G., Fucharoen, S., Jetsrisuparb, A. & Fukumaki, Y. (1991) Eight-base deletion in exon 3 of the β -globin gene produced a novel variant (β -Khon-Kaen) with an inclusion body β -thalassemia trait. **Blood 78**: 537.
- Galacteros, F., Kleman, K., Caburi-Martin, j. Beuzard, Y., Rosa, J. & Lubin, B. (1980). Cord blood screening for hemoglobin abnormalities by thin layer isoelectric focusing. **Blood 56**: 1068.
- Gallagher, P.G., Tse, W.T., Costa, F.F., Pothier, B., Scarpa, A., Delaunay, J. & Forget, B.G. (1991). A splice site mutation of the β -spectrin gene causing exon skipping in hereditary elliptocytosis associated with a truncated β -spectrin chain. **J Biol Chem 266**: 23.
- Gerald, P.S. & Diamond, L.K. (1958). A new hereditary hemoglobinopathy (the Lepore trait) and its interaction with thalassemia trait. **Blood 13**: 835.
- Giacometti, G.M., Di Torio, E.E., Antonini, E., Brunori, M. & Winterhalter, K.H. (1977). Binding of carbon monoxide to hemoglobin Zürich. **Eur J Biochem 75**: 267.
- Gill, F., Atwater, J. & Schwartz, E. (1972). Hemoglobin Lepore trait: globin synthesis in bone marrow and peripheral blood. **Science 178**: 623.
- Gusella, J., Varsanyi-Briener, A., Kao, F.T., Jones, C., Puck, T.T., Keys, C. Orkin, S. & Huisman, D. (1979). Precise localization of human β -globin gene complex on chromosome 11. **Proc Natl Acad Sci USA 76**: 5239.
- Harley, J.D. & Mauer, A.M. (1961). Studies on the formation of Heinz bodies II. The nature and significance of Heinz bodies. **Blood 17**: 418.
- Hayashi, H. (1991). PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. **PCR Methods and Applications 1**: 34.

- Hitzig, W.H., Frick, P.G., Betke, K. & Huisman, T.H.J. (1960). Hemoglobin Zürich: eine neue Hemoglobinanomalie mit sulfonamidinduzierter innernkörperanemie. **Helv Paediatr Acta** 15: 499.
- Honig, G.R., Green, D. Shamsuddin, M. Vida, L.N., Mason, R.G., Gnarra, D.J. & Mauer, H.S. (1973). Hemoglobin Abraham Lincoln, β 32(B14) Leucine-Proline. An unstable variant producing severe hemolytic disease. **J Clin Invest** 52: 1746
- Huisman, T.H.J. (1981). The human fetal hemoglobins. **Tex Rep Biol Med** 40: 29.
- Huisman, T.H.J. (1986). **Methods in Hematology**. Churchill Livingstone, Edinburgh, vol. 15.
- Huisman, T.H.J. (1990). Frequencies of common β -thalassemia alleles among different populations: variability in clinical severity. **Brit J Haem** 75: 454.
- Hunt, J.A. & Ingram, V.M. (1960). Abnormal human haemoglobins. IV. The chemical difference between normal human haemoglobin and haemoglobin C. **Biochim Biophys Acta** 42: 409.
- Iannuzzi, M.C. Stern, R.C., Collins, F.S., Hon, C.T., Hidaka, N., Strong, T., Becker, L. Drumm, M.L., White, M.B., Gerrard, B. & Dean, M. (1991). Two frameshift mutations in the cystic fibrosis gene. **Am J Hum Genet** 48: 227.
- Iolascon, A, Francese, M. & Pinto L. (1992). Hb Lepore in Campania: a study using a rapid molecular approach. **Haematologica** 77: 291.
- Ingram, V.M. (1956). A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. **Nature** 178: 792.
- Itano, H.A. & Neel, J.V. (1950). A new inherited abnormality of human hemoglobin. **Proc Natl Acad Sci USA** 36: 613.
- Jeffreys, A.J., Craig, I.W. & Francke, U. (1979). Localization of the G_{γ} , A_{γ} , δ - and β -globin genes on short arm of human chromosome 11. **Nature** 282: 606.
- Kan, Y.W. & Dozy, A.M. (1978). Antenatal diagnosis of sickle cell anemia by DNA analysis of amniotic fluid cells. **Lancet** 2: 910.
- Kazazian Jr, H.H. (1990). The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. **Sem in Hematol** 27: 209.
- Kazazian Jr, H.H., Orkin, S.H., Antonarakis, S.E. (1984). Molecular characterization of seven β -thalassemia mutations in Asian Indias. **EMBO J** 3: 593.

- Konotey-Ahulu, F.I.D. (1974). The sickle cell disease: clinical manifestations including the "sickle crisis". **Arch Inter Med** 133: 611.
- Labie, D., Schoroeder, W.A., Huisman, T.H.J. (1966). The amino acid sequence of the α -chains of hemoglobin Lepore Augusta-Lepore Washington. **Biochim Biophys Acta** 127: 428.
- Lanclos, K.D., Patterson, J., Efremov, G.D., Wong, S.C., Villegas, A., Ojwang, P.J., Wilson, J.B., Kutlar, F., Huisman, T.H.J. (1987). Characterization of chromosomes with hybrid genes for Hb Lepore-Washington, Hb Lepore-Baltimore, Hb P-Nilotic, and Hb Kenya. **Hum Gen** 77: 40.
- Lauer, J., Shen, C.K. & Maniatis, T. (1980). The chromosomal arrangement of human α -like globin genes: sequence homology and α -globin gene deletions. **Cell** 20: 119.
- Lawn, R.M., Frisch, E.F., Parker, R.C., Blake, G. & Maniatis, T. (1978). The isolation and characterization of linked δ - and β -globin genes from a cloned library of human DNA. **Cell** 15: 1157.
- Lawn, R.M. Efstratiadis, A., O'Connell, C. & Maniatis, T. (1980). The nucleotide sequence of human β globin gene. **Cell** 21: 647.
- Lebo, R.V., Carrano, A.V., Burkhart-Schultz, K. Dozy, A.M., Yu, L.-C. & Kan, Y.W. (1979) Assignment of human β -, γ -, and δ -globin genes to the short arm of chromosome 11 by sorting and DNA restriction enzyme analysis. **Proc Natl Acad Sci USA** 76: 5804.
- Lehmann, H. (1986). Human hemoglobin variants. In: H.F. Bunn & Forget, B.G. (ed): **Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects**. WB Saunders Company.
- Liu, T.C., Yen, J.S., Shen, J.S., Chen, Y.H., Lee, L.S., Chen, P.H. & Chang, J.G. (1992). Rapid molecular diagnosis of hemoglobin variants by RT-PCR of reticulocyte in mRNA and direct sequencing. **Hemoglobin** 16: 379.
- Lolski, G.B. & Miller D.R. (1976). Heme synthesis in hereditary hemolytic anemias: decrease δ -aminolevulinic acid synthetase in hemoglobin Köln disease. **Pediat Res** 10: 702.
- Maniatis, T., Fritsch, EF., Lauer, J. & Lawn, R.M. (1980). The molecular genetics of human hemoglobin. **Ann Rev Genet** 14: 145.
- Marengo-Rowe, A.J. (1965). Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. **J Clin Pathol** 18: 790.

- Marinucci, M., Mavilio, F., Massa, A., Gabbianelli, M., Fontanarosa, P.P., Samoggia, P., Tentori, L. (1979). Hemoglobin Lepore trait: haematological and structural studies on the Italian population. **Br J Haematol** 42: 557.
- Martins, C.S.B. (1993). Caracterização molecular de heterozigotos da talassemia β . **Tese de Doutorado**, Genética e Evolução - Instituto de Biologia - UNICAMP.
- Masala, B., Manca, L., Wilson, J.B., Webber, B.B., Kutlar, A., Huisman, T.H.J. (1990). Hb Lepore-Baltimore in a North Sardinian family. **Hemoglobin** 14: 241.
- Mavilio, F., Giampaolo, A., Caré, A., Sposi, N.M. & Marinucci, M. (1983). The crossover region in Lepore Boston hemoglobinopathy is restricted to a 59 base pairs region around the 5' splice junction of the large globin gene intervening sequence. **Blood** 62: 230.
- McKusick, V.A. (1990). **Mendelian inheritance in man**. 9ª edição, Jonh Hopkins University Press, Baltimore.
- Metzenberg, A.B., Wurzer, G., Huisman, T.H.J., Smithies, O. (1991). Homology requirements for unequal crossing over in humans. **Genetics** 128: 143.
- Miller, D.R., Weed, R.I., Stamatoyannopoulos, G. & Yoshida, A. (1971). Hemoglobin Köln disease occurring as a fresh mutation: erythrocyte metabolism and survival. **Blood** 38: 715.
- Milner, P.F. (1974). The sickling disorders. **Clin Haematol** 3: 289.
- Moo-Penn, W.F., Jue, D.L., Johnson, M.H., Bechtel, K.C. & Patchen, L.C. (1980). Hemoglobin variants and methods used for their characterization during 7 years of screening at the Center for Disease Control. **Hemoglobin** 4: 347.
- Morton, C.C., Kirsch, I.R., Taub, R., Orkin, S.H. & Brown, J.A. (1984). Localization of the β -globin gene by chromosomal in situ hybridization. **Am J Hum Gen** 36: 576.
- Muller, C.J. & Kingma, S. (1961). Hemoglobin Zürich, $\alpha_2\beta_2^{63\text{Arg}}$. **Biochim Biophys Acta** 50: 595.
- Murakami, Y., Katahira, M., Makino, R., Hayashi, K., Hirohashi, S. & Sekyia, T. (1991). Inactivation of retinoblastoma gene in a human lung carcinoma cell line detected by single-strand conformation polymorphism analysis of the polymerase chain reaction product of cDNA. **Oncogene** 6: 37.
- Myers, R.M. & Maniatis, T. (1986). Recent advances in the development of methods for detecting single-base substitutions associated with human genetic diseases. **Cold Spring Harbor Symp Quant Biol** 51: 275.

- Myers, R.M., Lumelsky, N., Lerman, L.S. & Maniatis, T. (1985a). Detection of single base substitutions in total genomic DNA. **Nature** 313: 495.
- Myers, R.M., Fischer, S.G., Maniatis, T. & Lerman, L.S. (1985b). Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucl Acid Res** 13: 3111.
- Myers, R.M., Fischer, S.G., Lerman, L.S. & Maniatis, T. (1985c). Nearly all single base substitution in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucl Acid Res** 13: 3131.
- Naoum, P.C., Domingos, C.R.B., Moreira, H.W. & Alvares Fo, F. (1993). Hb Köln or $\alpha 2\beta 2$ 98 (FG5) Val-Met in Brazil. **5th International Conference on thalassemias and the haemoglobinopathies**. Nicosia, Cyprus.
- Naylor, J.A., Green, P.M., Montandon, A.J., Rizza, C.R. & Giannelli, F. (1991) **Lancet** 337: 635.
- Nazari, G. & Rahbar, S. (1991). Combination of PCR and single-stranded conformation polymorphism (PCR-SSCP) for scanning β -thalassemia alleles. **Blood** 78 (suppl 1): 194a.
- Novelleto, A., Hafez, M. Deidda, G., DiRenzo A., Felecetti, L. El-Tahan, H., Morsi, Z.E., El Ziny, M., Altonbary, Y., Sittien, A. & Terrenato, L. (1990). Molecular characterization of β -thalassemia mutations in Egypt. **Hum Gen** 85: 272.
- Ohba, Y. (1990). Unstable hemoglobins. **Hemoglobin** 14: 353.
- Orita, M. Hiroyuki, I., Kanazawa, H. Hayashi, K. & Sekiya, T. (1989a). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc Natl Acad Sci USA** 86: 2766.
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. & Hayashi, K. (1989b). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomics** 5: 874.
- Orkin, S.H. & Kazazian Jr, H.H. (1984). The mutation and polymorphism of the human β -globin gene and its surrounding DNA. **Ann Rev Genet** 18: 131.
- Ostertag, W., Smith, E.W. (1969). Hemoglobin Lepore Baltimore: a third type of crossing over. **Eur J Biochem** 10: 3 71.
- Pauling, L., Itano, H., Singer, S.J. & Wells, I.C. (1949). Sickle cell anemia: A molecular disease. **Science** 110: 543.

- Pedersen, P.R., McCurdy, P.R., Wrightstone, R.N., Wilson, J.B., Smith, L.L. & Huisman, T.H.J. (1973). Hemoglobin Köln in a black: pre- and post- splenectomy red cell survival (DF32P and 51Cr) and the pathogenesis of hemoglobin instability. **Blood** 42: 771.
- Pembrey, M.E., MacWade, P. & Weatherall, D.J. (1972). Reliable routine estimation of small amounts of foetal haemoglobin by alkali denaturation. **J Clin Pathol** 25: 738.
- Perutz, M.F. (1987). Molecular anatomy, physiology and pathology of hemoglobin. In: G. Stamatoyannopoulos, Nienhuis, A.W., Leder, P. & Majerus, P.W. (ed.) **The molecular basis of blood diseases**. WB Saunders, Philadelphia.
- Rahbar, S., Lee, T. & Asmeron, Y. (1991). Hb Beckman $\alpha 2\beta 2$ 135 (H13) Ala-Glu: a new unstable variant and reduced oxygen affinity. **Blood** 78 (suppl 1): 204a.
- Ramalho, A.S. (1976). Investigação genético-epidemiológica das talassemias $\delta \epsilon \beta$ no Estado de São Paulo. **Rev Paul Med** 88: 68.
- Ramalho, A.S., Magna, L.A., Costa, F.F. & Grotto, H.Z. (1985). Talassemia menor: um problema de saúde p blica no Brasil? **Rev Bras Genet** VIII 4: 747.
- Ramot, B., Kinderlerer, J.B. & Lehmann, H. (1972). Cited in WHO Technical Report Series n . 509, Annex 1, Geneva, World Health Organization.
- Ranney, H.M., Jacobs, A.S., Udem, L. & Zalusky, R. (1968). Hemoglobin Riverdale-Bronx, an unstable hemoglobin resulting from the substitution of arginine for glycine at helical residue B6 of the β polypeptide chain. **Biochim Biophys Acta** 33: 1004.
- Rawn, J.D. (1989). **Biochemistry**, Neil Patterson Publishers, North Carolina.
- Rieder, R.F., Zinkham, W.H. & Holtzman, N.A. (1965). Hemoglobin Zürich. Clinical, chemical and kinetic studies. **Am J Med** 39: 4.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higushi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA thermostable polymerase. **Science** 239: 487.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA** 74: 5463.
- Saunders-Haigh, L., Anderson, W.F. & Francke, U. (1980). The β -globin gene is on the short arm of human chromosome 11. **Nature** 283: 683.
- Schneider, R.G. & Barwick, R.C. (1982). Hemoglobin mobility in citrate agar electrophoresis - its relationship to anion binding. **Hemoglobin** 6: 199.

- Schroeder, W.A. (1980). The synthesis and chemical heterogeneity of human fetal hemoglobin. **Hemoglobin 4**: 431.
- Scott, J.L., Haut, A., Cartwright, G.E. & Wintrobe, M.M. (1960). Congenital hemolytic disease associated with red cell inclusion bodies, abnormal pigment metabolism and electrophoretic hemoglobin abnormality. **Blood 16**: 1239.
- Scott, A.F., Phillips, J.A. & Migeon, B.R. (1979). DNA endonuclease analysis for localization of human β - and δ -globin genes on chromosome 11. **Proc Natl Acad Sci USA 76**: 4563.
- Serjeant, G.R. **Sickle cell disease**. (1992), 2ªedição, Oxford University Press, New York.
- Sheffield, V.C., Cox, D.R., Lerman, L.R. & Myers, R.M. (1989). Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. **Proc Natl Acad Sci USA 86**: 232.
- Shen, S.-H., Slightom, J.L. & Smithies, O. (1981). A history of the human fetal globin gene duplication. **Cell 26**: 191.
- Sick, K., Beale, D., Irvine, D., Lehmann, H., Goodall, P.T. & MacDougall, S. (1967). Hemoglobin G Copenhagen and haemoglobin J Cambridge. Two new β chain variants of hemoglobin A. **Biochim Biophys Acta 140**: 231.
- Slightom, J.L., Blechl, A.E. & Smithies, O. (1980). Human fetal G_{γ} and A_{γ} globin genes: complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicate genes. **Cell 21**: 627.
- Spritz, R.A., deRiel, J.K., Forget, B.G. & Weissman, S.M. (1980). Complete nucleotide sequence of the human δ -globin gene. **Cell 21**: 638.
- Stamatoyannopoulos, G., Nienhuis, A.W., Leder, P., Majerus, P.W. (1987). **The molecular basis of blood diseases**. WB Saunders, Philadelphia.
- Strahler, J.R., Rosenbloom, B.B. & Hanash, S.M. (1983). A silent neutral substitution detected by reverse phase high performance liquid chromatography: Hemoglobin Beirut. **Science 221**: 860.
- Sutton, M., Bouhassira, E.E., Nagel, R.L. (1989). Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene cluster. **Am J Hematol 32**: 66.
- Suzuki, Y., Sekiya, T. & Hayashi, K. (1990). Allele-specific PCR: a method for amplification and sequence determination of a single component among a mixture of sequence variants. **Anal Biochem 192**: 82.

- Tilghman, S.M., Tiemeier, D.C., Seidman, J.G., Peterlin, B.M., Sullivan, M., Marzel, J.V. & Leder, P. (1978). Intervening sequences of DNA identified in the structural portion of the mouse β -globin gene. **Proc Natl Acad Sci USA** 75: 725.
- Tondo, C.V. & Salzano, F.M. (1962). Abnormal hemoglobins in a Brazilian Negro population. **Am J Hum Genet** 14: 401.
- Tondo, C.V., Salzano, F.M. & Rucknagel, D.L. (1963). Hemoglobin Porto Alegre a possible polymer of normal hemoglobin in a Caucasian Brazilian family. **Am J Hum Genet** 15: 265.
- Tondo, C.V., Bonaventura, C., Brunori, M. & Antonini, E. (1974). Functional properties of hemoglobin Porto Alegre ($\alpha^A_2\beta^O_2$ Ser-Cys) and the reactivity of its extra cysteinyl residue. **Biochim Biophys Acta** 342: 15.
- Tse, W.T., Lecomte, M.C., Costa, F.F., Garbarz, M., Feo, C., Boivin, P., Dhermy, D. & Forget, B.G. (1990). **J Clin Inv** 86: 909.
- Tse, W.T., Gallagher, P.G., Costa, F.F., Pothier, B., Scarpa, A., Delaunay, J. & Forget, B.G. (1991) **Blood** 78: 517.
- Virshup, D.M., Zinkham, W.H., Sirota, R.L. & Caughey, W.S. (1983). Unique sensitivity of Hb Zürich to oxidative injury by phenazopyridine: reversal of the effects by elevating carboxyhemoglobin levels *in vivo* and *in vitro*. **Am J Hematol** 14: 315.
- Wajcman, H., Vasseur, C., Blouquit, Y. & Galacteros, F. (1991a). Hb Zaire and Hb Duino: two new human hemoglobin variants due rare mutational events. **Blood** 78 (suppl 1): 205a.
- Wajcman, H., Kister, J., Vasseur, C., Blouquit, Y., Behnken, J.L. & Galacteros, F. (1991b). Hb Ingelheim [β 99 (G1) Asp-Glu]: a new high affinity hemoglobin variant destabilizing the α 1 β 2 interface. **Blood** 78 (suppl 1): 206a.
- Weatherall, D.J. (1991). **The new genetics and clinical practice**. Oxford University Press, Oxford.
- Weatherall, D.J. & Clegg, J.B. (1981). **The thalassemia syndromes**. 3^a edição, Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Weatherall, D.J., Clegg, J.B., Higgs, D.R., Wood, W.G. (1989). The hemoglobinopathies. In: C.R., Scriver, Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D. **The metabolic basis of inherited disease**. 6^a edição, Mac Graw Hill, New York.

- Winichagoon, P., Higgs, D.R., Goodbourn, S.E.Y., Lamb, J., Clegg, J.B. & Weatherall, D.J. (1982). Multiple arrangements of the human embryonic zeta globin genes. **Nucleic Acids Res** 10: 5853.
- World Health Organization: Hemoglobinopathies and Allied Disorders. (1966). W.H.O. Technical Report Series 338.
- World Health Organization: Hemoglobinopathies and Allied Disorders. (1982). W.H.O. Technical Report Series 354.
- William, J.W., Beutler, E., Erslev, A.J. & Lichtman, M.A. (1990). **Hematology**. 4ª edição. McGraw Hill Pub. Company, New York.
- Wilkinson, T., Chua, C.G., Carrell, R.W., Robin, H. Exner, T. Lee, K.M. & Kronenberg, H. (1975). Haemoglobin Camperdown β 104(G6) Arginine-Serine. **Biochim Biophys Acta** 393: 195.
- Winter, W.P. & Yodh, J (1983). Interaction of human hemoglobin and variants with agar. **Science** 221: 175.
- Wood, W.G., Bunch, C., Kelly, S. Gunn, Y. & Breckon, G. (1985). Control of haemoglobin switching by a developmental clock? **Nature** 313: 320.
- Zago, M.A., Costa, F.F., & Bottura, C. (1981). β -thalassemia in Brazil. **Rev Pesq Med Biol** 14: 383.
- Zago, M.A., Costa, F.F. & Bottura, C. (1982). Teste de solubilidade quantitativo modificado em hemolisados normais e em variantes de hemoglobina. **Rev Paul Med** 100: 15.
- Zago, M.A. & Costa, F.F. (1985). Hereditary haemoglobin disorders in Brazil. **Trans Royal Soc Trop Med Hyg** 79: 385.
- Zago, M.A. & Costa, F.F. (1988). Hb D-Los Angeles in Brazil: simple heterozygotes and associations with β -thalassemia and with Hb S. **Hemoglobin** 12: 399.
- Zago, M.A., Baffa, O., Costa, F.F. & Bottura, C. (1988). Hemichrome formation during hemoglobin Zürich denaturation. **Ann Acad bras Ci** 60: 149.
- Zeng, Y., Huang, S., Ren, Z. & Zi, H. (1989). Identification of Hb D-Punjab gene: Application of DNA amplification in the study of abnormal hemoglobin. **Am J Hum Gen** 44: 886.
- Zinkham, W.H., Houtchens, R.A. & Caughey, W.S. (1980). Carboxyhemoglobin levels in an unstable hemoglobin disorder (Hb Zürich): Effect on phenotypic expression. **Science** 209: 406.

Zinkham, W.H., Houtchens, R.A. & Caughey, W.S. (1983). Relation between variations in the phenotypic expression of an unstable hemoglobin disorder (Hemoglobin Zürich) and carboxihemoglobin levels. *Am J Med* 74: 23.