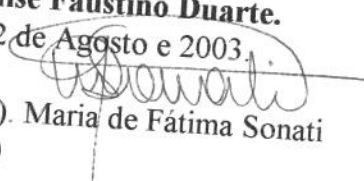


DENISE FAUSTINO DUARTE

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso
de Pós-Graduação Ciências Médicas da
Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP,
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Médicas, área de Ciências Biomédicas do(a)
aluno(a) **Denise Faustino Duarte**.
Campinas, 22 de Agosto e 2003.


Prof(a). Dr(a). Maria de Fátima Sonati
Orientador(a)

**ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DOS GENES DA GLOBINA γ
EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

Campinas

2003

200404945

DENISE FAUSTINO DUARTE

***ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DOS GENES DA GLOBINA γ
EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas, na área de Ciências Biomédicas.*

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria de Fátima Sonati

Campinas

2003

ii



JNIDADE 86
Nº CHAMADA 11 UNICAMP
D85a
V EX
TOMBO BC/ 57387
PROC 16-117-04
C D X
PREÇO 11,00
DATA
Nº CPD

CM00196155-1

Bibid 314844

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

D85a Duarte, Denise Faustino
 Alterações estruturais dos genes da globina γ em uma população
 brasileira / Denise Faustino Duarte. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

 Orientador : Maria de Fátima Sonati
 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Hemoglobinopatias. 2. Hemoglobina fetal. I. Maria de Fátima
 Sonati. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
 Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria de Fátima Sonati

Membros:

1. Profª Drª Maria de Fátima Sonati

2. Profª Drª Carmem Silvia Bertuzzo

3. Profª Drª Marilda de Souza Gonçalves

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 22/08/2003

DEDICATÓRIA

À Deus por ter me conduzido ao longo desta jornada.

À minha mãe Vera Lúcia por ser minha grande amiga de todos os momentos, fáceis e difíceis. Por sempre me fazer acreditar que amanhã seria um dia melhor e pelas constantes orações.

Ao meu pai Gerson pela sua dedicação à família, e por ser um grande exemplo de dignidade, honestidade e seriedade.

Ao meu irmão Denilson pelos nossos longos e produtivos diálogos e por todo carinho e cuidado.

Aos meus amados irmãos Darilson e Elisângela pelo carinho.

Ao meu namorado Mauro pelo carinho, compreensão, dedicação, e pelo incentivo à prosseguir.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati pela oportunidade, pela orientação e por preocupar-se sempre em nos transmitir toda sua experiência profissional, nos incentivando a voar mais alto.

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa pelas correções dos manuscritos e pela disponibilização de equipamentos necessários à execução deste trabalho.

À Bióloga Dulcinéia M Albuquerque, do Hemocentro, pelo auxílio prestado durante a execução deste trabalho e pelo carinho e amizade.

Aos Professores do Depto. de Patologia Clínica, que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação acadêmica, em especial à Professora Helena Grotto.

À Elza Kimura e a Sirley Gervázio, pelo grande auxílio na execução deste trabalho e pela amizade.

À Laudicéia, Tânia, Fernando e Denise pelo apoio, amizade e pelos momentos de descontração.

À Dani, Simone B. de Jorge, Nádia e Simone Sant'Anna, amigas que surgiram ao longo deste trabalho, e que pudemos compartilhar momentos importantes desta trajetória. Amizades preciosas que ficarão guardadas no coração.

Aos Funcionários e alunos do Laboratório de Hematologia pela colaboração.

Às Carmens Silvias e à Iara pelo carinho e exemplo de profissionalismo.

Aos meus sobrinhos: Jamile, Rafael, Leticia, Emily, Lainara e Felipe por todo amor, carinho e pelas muitas cartinhas com doces declarações de amor. E ao “nosso bebê” Icaro por encher a casa de alegria.

Às tias Olívia e Leonor pelo apoio e pelas preciosas orações.

À minha amiga Andréia de Camargo pelo incentivo e grande amizade, e por estar sempre pronta à estender a mão.

	<i>Pág</i>
RESUMO	<i>vii</i>
ABSTRACT	<i>ix</i>
1- INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1- As Hemoglobinas Humanas.....	12
1.2- Os Genes de Globinas.....	14
1.3- A Hemoglobina Fetal (Hb F).....	16
1.4- Variantes Estruturais da Hb F.....	16
1.5- Formação Étnica da População Brasileira.....	18
2- OBJETIVOS	21
3- CAPÍTULOS	23
3.1- Capítulo1: B F-Campinas $\gamma^I121(\text{GH4})\text{GLU}\rightarrow\text{GLN}$], HBF Joanopolis [$\gamma^G73(\text{E17})\text{ASP}\rightarrow\text{ALA}$] and HBF Paulinia [$\gamma^G80(\text{EF4})\text{ASP}\rightarrow\text{TYR}$]: Three Novel Structural variants of Fetal Hemoglobin.....	24
3.2- Capítulo 2: Structural Alteration of γ -Globin Genes in a Brazilian Population.....	33
4- CONCLUSÃO GERAL	41
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45



RESUMO

No presente trabalho foram identificadas as alterações dos genes de globina γ em 34 recém-nascidos (RN) não relacionados procedentes de Campinas e região, no sudeste do Brasil, que apresentaram hemoglobina fetal (Hb F) anômala ao nascimento. A metodologia empregada foi o sequenciamento de DNA, manual e automatizado, após a amplificação diferencial dos genes γ pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Estas alterações foram confirmadas por análise com enzimas de restrição, sequenciamento da fita oposta e análise familiar. Foram encontradas 3 novas variantes [Hb F-Campinas ($^A\gamma 121$ Glu $\rightarrow$ Gln), Hb-F Paulínia ($^G\gamma 80$ Asp $\rightarrow$ Tyr) e Hb F-Joanópolis ($^G\gamma 73$ Asp $\rightarrow$ Ala)], além de 6 variantes previamente descritas [Hb F-Carlton ($^G\gamma 121$ Glu $\rightarrow$ Lys) (13 casos), Hb F-Dickinson ($^A\gamma^T 97$ Hist $\rightarrow$ Arg) (7 casos), Hb F-Port Royal ($^G\gamma 125$ Glu $\rightarrow$ Ala) (7 casos), Hb F-Pendergrass ($^A\gamma 36$ Pro $\rightarrow$ Arg) (2 casos), Hb F-Yamaguchi ($^A\gamma^T 80$ Asp $\rightarrow$ Asn) e Hb F-Urumqi ($^G\gamma 22$ Asp $\rightarrow$ Gly)], todas em heterozigose. Nenhum RN apresentou manifestações clínicas ou hematológicas, significando que as substituições ocorridas não comprometeram a estabilidade ou a função da molécula, ou que a proporção formada não foi suficiente para ocasionar alterações hematológicas. De nosso conhecimento, estes são os primeiros dados sobre as variantes estruturais de Hb F presentes no Brasil. As variantes já descritas aqui encontradas, por vezes em indivíduos de descendência diversa daquela dos primeiros portadores detectados, refletem a origem étnica miscigenada da população brasileira e podem constituir polimorfismos genéticos relacionados aos genes γ .



ABSTRACT

We identified the γ -globin gene alterations in 34 unrelated newborns from Campinas region, Southeastern Brazil, who presented anomalous fetal hemoglobin (Hb F) at birth. The methodology employed was manual and automated sequencing of the PCR amplified γ -genes, restriction enzymes and familial analyzes. We found 3 novel variants [Hb F-Campinas ($^A\gamma^{121}$ Glu→Gln), Hb-F Paulínia ($^G\gamma^{80}$ Asp→Tyr) and Hb-F Joanópolis ($^G\gamma^{73}$ Asp→Ala)], in addition to 6 previously reported variants [Hb F-Carlton ($^G\gamma^{121}$ Glu→Lys) (13 cases), Hb F-Dickinson ($^A\gamma^T$ 97 Hist→Arg) (7 cases), Hb F-Port Royal ($^G\gamma^{125}$ Glu→Ala) (7 cases), Hb F-Pendergrass ($^A\gamma^{36}$ Pro→Arg) (2 cases), Hb F-Yamaguchi ($^A\gamma^T$ 80 Asp→Asn) and Hb F-Urumqi ($^G\gamma^{22}$ Asp→Gly)], all in heterozygosis. No clinical or hematological alterations were observed in any case. To our knowledge, these are the first data on the Hb F structural variants present in Brazil. The previously described variants were sometimes detected in individuals with different ethnical backgrounds from those in which they were previously found and reflect the mixed ethnical origin of the Brazilian population. They may constitute genetic polymorphisms related to the γ -globin genes.



1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1- AS HEMOGLOBINAS HUMANAS

As Hemoglobinas (Hbs) humanas são pigmentos respiratórios especializados no transporte de oxigênio (O_2) dos pulmões para os tecidos e de gás carbônico (CO_2) dos tecidos aos pulmões. São proteínas conjugadas, de peso molecular em torno de 64.450 daltons, compostas por dois pares de cadeias polipeptídicas (as globinas), associadas, cada uma delas, a um grupo protético heme, formado pela combinação de um átomo de ferro com uma molécula de protoporfirina (Fig.1)^{1,2}.

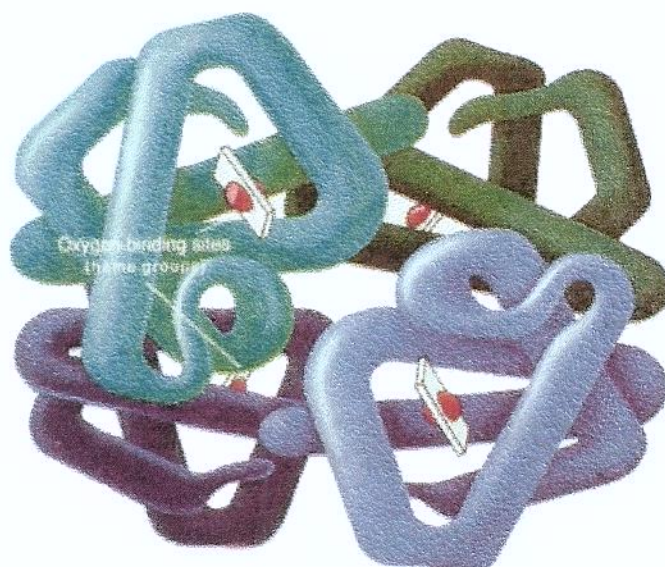


Figura 1- Representação esquemática da molécula de Hemoglobina Humana (adaptada de Dickerson & Gueiss, 1983)².

No período intra-uterino as Hbs são sintetizadas, inicialmente, no saco vitelínico, fase denominada de mesenquimal, que é seguida da fase visceral, que ocorre principalmente no fígado e no baço. Na vida pós-natal a síntese ocorrerá na medula óssea (fase medular)^{1,3}.

Existem seis tipos de cadeias globínicas: α , β , γ , δ , ϵ e ζ , que, combinadas duas a duas, formam os diferentes tipos de Hb. As cadeias α e ζ possuem 141 aminoácidos, enquanto que as cadeias β , γ , δ e ϵ possuem 146 resíduos^{1,3,4}.

As diferentes Hbs são produzidas em diferentes estágios do desenvolvimento. Assim, no estágio embrionário, são produzidas as Hbs Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland I ($\zeta_2\gamma_2$); no período fetal estas são substituídas pela Hb Fetal ou F ($\alpha_2\gamma_2$), que, por sua vez, dará lugar às hemoglobinas A ou A₁ ($\alpha_2\beta_2$), e A₂ ($\alpha_2\delta_2$) na fase adulta. Em indivíduos adultos normais, a Hb A é predominante, compondo mais de 95 % do total da hemoglobina celular, enquanto a A₂ se mantém em níveis entre 2-3% e a Fetal entre 0-2%. A substituição gradual da Hb F pelas Hbs A e A₂ se completa seis meses após o nascimento (Fig. 2)^{1,3,4}.

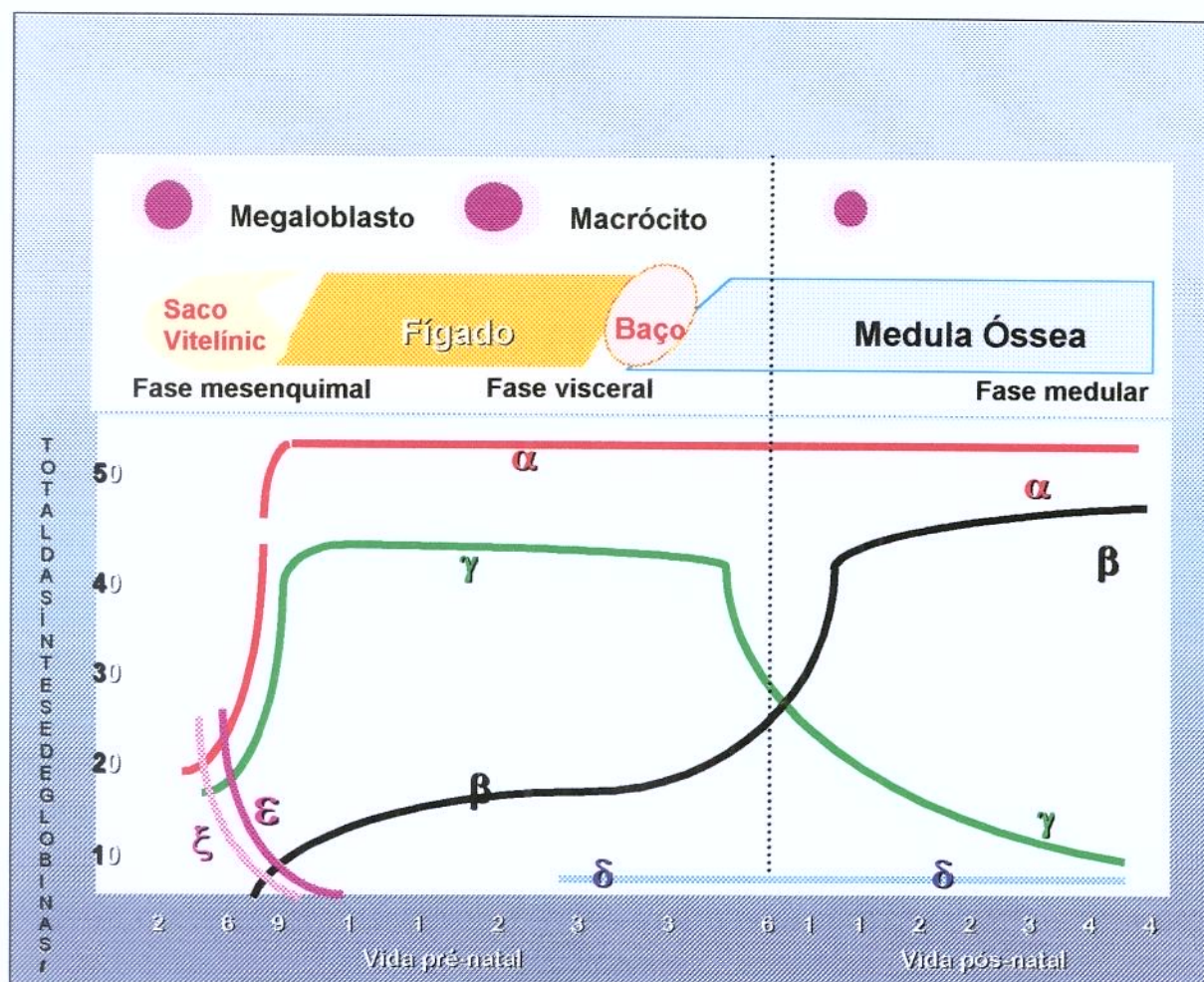


Figura 2- Síntese das cadeias globínicas na vida pré e pós natal (adaptado de Bunn & Forget, 1986)¹.

1.2- OS GENES DE GLOBINAS

A síntese das cadeias globínicas está sob o controle de genes distintos e, para que o tetrâmero funcional possa ser formado, é preciso que a expressão desses genes se dê de forma equilibrada. Eles estão separados em dois agrupamentos ("clusters"): o "cluster" α , localizado no braço curto do cromossomo 16 (16p 13.3), contém os genes ζ , α_2 , α_1 , os pseudogenes $\Psi\zeta$, $\Psi\alpha_2$, $\Psi\alpha_1$, e o gene θ_1 , na seguinte ordem: $5' - \zeta, \Psi\zeta, \Psi\alpha_2, \Psi\alpha_1, \alpha_2, \alpha_1, \theta_1 - 3'$. O "cluster" β , localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p 15.5),

contém os genes ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ e β e o pseudogene $\psi\beta$, na seguinte ordem : 5' - ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, $\psi\beta$, δ , β - 3'. Os pseudogenes, representados pela letra ψ , são incapazes de codificar proteínas e o gene θ é de função indeterminada¹.

Todos os genes de globina são compactos: possuem cerca de 1 a 2 Kb de DNA e são compostos por três exons e dois introns(figura 3)^{1,4}.

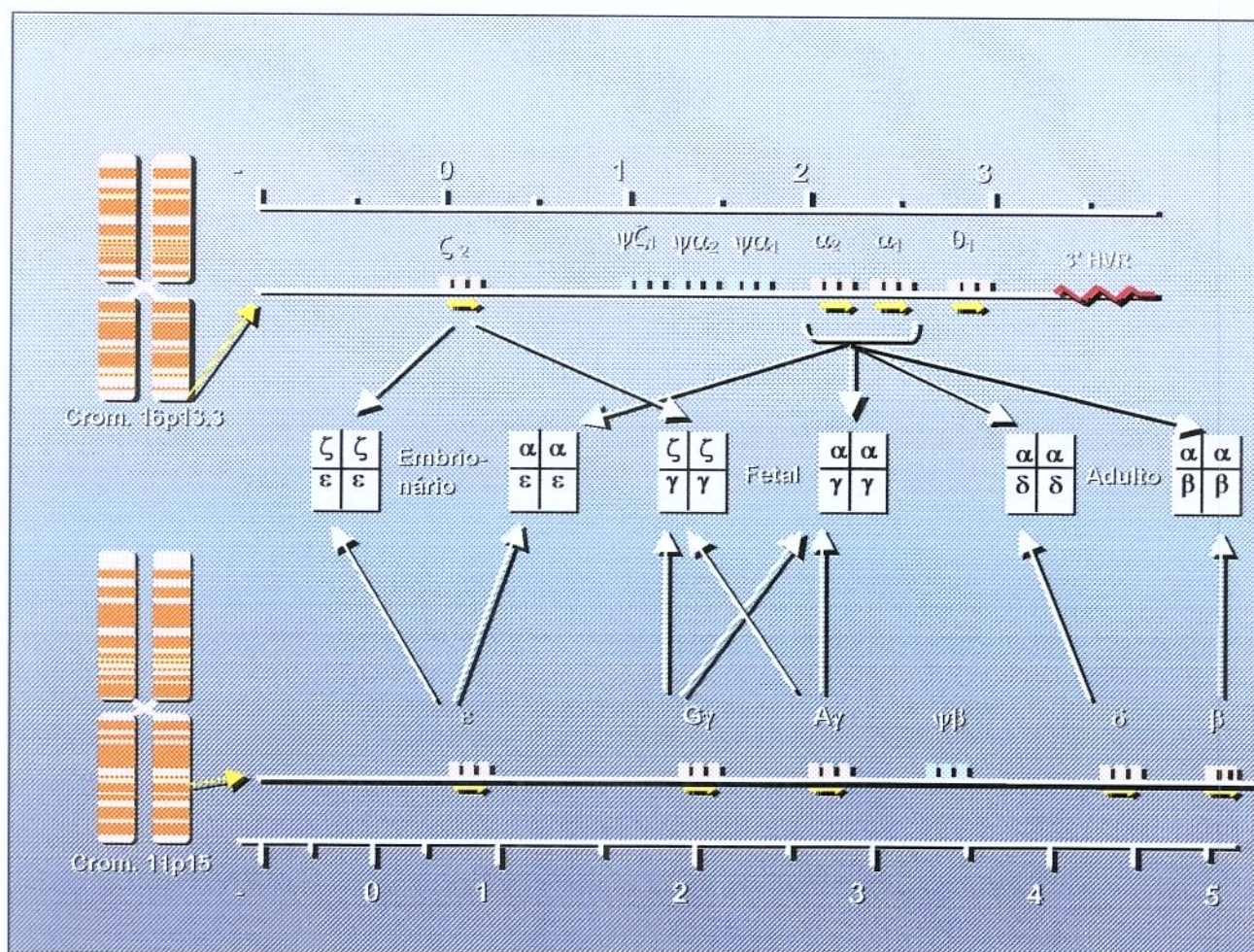


Figura 3- Organização dos agrupamentos dos genes de globinas nos cromossomos 16 e 11 (adaptado de Giordano, 1998 – Tese de Doutorado)⁵.

1.3- A HEMOGLOBINA FETAL (Hb F)

A Hb F humana é predominantemente produzida durante toda a vida fetal, constituindo cerca de 50 a 90% da Hb total em fetos, com valor médio de 75% observado em recém-nascidos. Durante os primeiros 6 meses de vida extra-uterina ocorre a substituição gradual da Hb F pela Hb A. Após este período, níveis de Hb F acima de 2% são observados apenas e principalmente nas Persistências Hereditárias da Hemoglobina Fetal (PHHF), nas Talassemias β , na Anemia Falciforme e nas leucemias e outras doenças mieloproliferativas^{1,4}.

Os genes responsáveis pelas síntese de cadeias γ estão localizados no “cluster” β , no braço curto do cromossomo 11 (11p 15.5). Eles são duplicados e codificam cadeias que diferem apenas na posição 136: no gene $^A\gamma$, o resíduo é alanina, enquanto no $^G\gamma$, glicina. A proporção de cadeias $^G\gamma/^A\gamma$ observada em fetos e recém-nascidos (RNs) é de 3:1, enquanto em adultos esta proporção é de 2:3. A sequência de aminoácidos das cadeias γ é bastante análoga à de cadeias β , estas proteínas diferem em apenas 10 dos 146 resíduos que as compõem. Segundo os pesquisadores, 4 destes resíduos podem contribuir para o aumento da estabilidade da Hb F, dificultando assim sua dissociação em monômeros, o que a torna uma Hb alcali resistente, propriedade que permite a sua separação (e quantificação) das demais Hbs. As cadeias $^G\gamma$ e $^A\gamma$ apresentam normalmente o aminoácido isoleucina na posição 75, mas cerca de 30% dos recém-nascidos caucasóides e 20% dos negróides, possuem um segundo alelo do gene $^A\gamma$, que codifica cadeia $^A\gamma$ com o resíduo treonina nesta posição (designado $^A\gamma^T$). Esta alteração foi denominada Hb F-Sardenia que, devido à sua elevada frequência, é considerada um polimorfismo genético¹.

1.4- VARIANTES ESTRUTURAIS DA HB F

Mutações nos genes das globinas resultam na produção de proteínas anômalas (hemoglobinopatias estruturais), na redução ou ausência de síntese de uma ou mais cadeias globínicas (talassemias) ou, ainda, na Persistência Hereditária de Hb Fetal (PHHF), com

quadro clínico discreto, associada a níveis elevados desta Hb, concomitante à total ausência da produção de cadeias β^1 .

As Hemoglobinopatias Estruturais são geralmente causadas por mutações de ponto ou pequenas inserções ou deleções de bases que afetam a região codificadora do gene e causam a substituição de aminoácidos na cadeia proteica¹.

No caso dos genes γ há, até o momento, 99 mutações descritas, 45 no $A\gamma$ e 54 no $G\gamma$, sendo 74 relacionadas à alteração de estrutura das cadeias γ e, portanto, à produção de Hbs F anômalas⁵. Estas variantes são normalmente detectadas em programas de triagem neonatal. As técnicas mais empregadas para detecção são a eletroforese de Hb em acetato de celulose (pH alcalino), a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e a focalização isoeletrica. Cerca de 95% das substituições de aminoácidos nas variantes envolvem a troca de carga, permitindo a separação desta Hb das demais^{1,6}.

Como já referido, as mutações nos genes de globina γ totalizam até o momento noventa e nove descrições encontradas em populações européias, asiáticas, africanas americanas. Cinquenta e quatro destas alterações estão relacionadas ao gene $G\gamma$, das quais sete levam à Persistência Hereditária da Hb Fetal (PHHF). Sendo uma delas, a PHHF-6, uma $G\gamma$ -talassemia. As HbF-M-Osaka [$G\gamma 63(E7)His \rightarrow Tyr$] e HbF-M-Fort Ripley [$G\gamma 92(F8)His \rightarrow Tyr$] são metemoglobinas, a HbF-Onoda [$G\gamma 146(HC3) His \rightarrow Tyr$] possui uma alta afinidade pelo oxigênio e a HbF-Poole [$G\gamma 130(H8) His \rightarrow Tyr$], é uma variante instável. Estas Hbs se correlacionam com manifestações clínicas no período neonatal, que incluem hemólise e cianose (no caso das variantes com afinidade pelo O_2 reduzida), hipóxia (no caso de afinidade aumentada) e anemia hemolítica no caso da Hb F-Poole. Todas elas constituem descrições esporádicas, com exceção da Hb F-M-Osaka, já detectada em indivíduos de origem japonesa, norueguesa, eslovaquia, espanhola, francesa e porto-riquenha. Quarenta e três são variantes da Hb F clinicamente silenciosas⁷.

Quarenta e cinco mutações afetam o gene $A\gamma$, sendo nove causas de PHHF, quatro de $A\gamma$ -Talassemia. A Hb Kenya, que é um híbrido $A\gamma$ - β (deleção de 22.5 kb de DNA), é também conhecida como PHHF-7, e se correlaciona com uma discreta microcitose

e hipocromia. A Hb F-Mauritius [γ 23(B5)Ala->0], causada pela deleção do codon 23 do gene, não resulta em quadro clínico importante, e as demais vinte e nove, causadas por simples substituições de bases, são variantes clinicamente silenciosas⁷.

Embora grande parte destas variantes não resultem em manifestações clínicas, seu estudo é de grande interesse do ponto de vista genético e bioquímico, contribuindo para uma melhor compreensão da relação entre a estrutura e a função das proteínas e entre os genes e seus produtos protéicos¹; além disso, elas podem ser usadas como marcadores de grupos étnicos, levando a um melhor conhecimento das correntes migratórias que compõem uma determinada população⁶.

O diagnóstico e identificação são também importantes, já que várias dessas Hbs apresentam migração eletroforética semelhante à de outras variantes de cadeias α e β prevalentes em nosso meio, como a Hb S e a Hb C^{1,6,7,8}.

1.5- FORMAÇÃO ÉTNICA DA POPULAÇÃO BRASILEIRA

A diversidade étnica da população brasileira teve início com a sua colonização pelos portugueses, particularmente intensa nos séculos XVI, XVII e XVIII. Durante este período também foram trazidos da África cerca de 3,5 milhões de escravos para o trabalho na lavoura e na mineração. Este foi o maior país de escravos dos tempos modernos e o mais dependente de trabalho escravo do continente americano. Eles pertenciam a várias etnias dos grupos banto e sudanês e falavam várias línguas. Os bantos, que representavam Angola, Congo e Moçambique, foram trazidos para o Rio de Janeiro e Minas Gerais, enquanto os sudaneses, vindos da Nigéria e do Benin, foram levados para Bahia^{9,10}.

Com a abertura dos portos, em 1808, a imigração foi legalizada. Imigrantes alemães fundaram inicialmente suas colônias no Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul. Por volta de 1840, surgiram novas colônias no Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina. No mesmo período, norte-americanos derrotados na Guerra de Secessão chegaram ao Brasil, à cidade de Americana, no interior de São Paulo^{10,11}.

O primeiro grupo de imigrantes italianos chegou ao Rio Grande do Sul em 1875. Os italianos que imigraram para o Brasil fugiam da guerra e da fome, perseguindo o sonho de pelo menos continuar a sobreviver como pequenos produtores rurais. A década de 70 marcou o início da maciça imigração italiana para as províncias do Sul e do Sudeste. Em São Paulo os italianos contribuíram de forma decisiva para a manutenção das lavouras de café e, posteriormente, no processo de urbanização e industrialização da capital ^{10,11}.

Os espanhóis, que já imigravam para a América Espanhola por questões históricas ou por exílio político, devido a profundas mudanças sócio-econômicas na Europa em geral, a partir de 1885 foram atraídos para o Brasil e de maneira mais intensa para os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Rio Grande do Sul ^{10,11}.

Em 1908 começaram a chegar os imigrantes japoneses; com o objetivo de prosperar, eles se estabeleceram inicialmente no estado de São Paulo e depois no Pará ^{10,11}.

Em 1948, os holandeses trocaram a Europa devastada durante a Segunda Guerra Mundial pela região fértil do interior paulista, e fundaram a mais conhecida das colônias holandesas no país, “a Cidade das Flores”, Holambra ^{10,11}.

Entre outros grupos de imigrantes que vieram para o Brasil, o maior destaque numérico cabe aos poloneses e ucranianos, que se fixaram em sua maioria no Paraná. Os sírio-libaneses distribuem-se por todo o território nacional; eles vieram principalmente na segunda metade do século XIX. Os judeus, sobretudo de origem alemã e eslava, vieram principalmente às vésperas e durante a Segunda Guerra Mundial, dirigindo-se para o sul e sudeste ^{10,11}.

Durante os anos 70 o Brasil passou a receber um expressivo número de sul-americanos representados principalmente pelos paraguaios, bolivianos, uruguaios, argentinos e chilenos. Nos anos 80, o fluxo maior passou a ser de coreanos ^{10,11}.

As regiões brasileiras que mais receberam imigrantes foram a sul e a sudeste. São Paulo, principalmente, recebeu quase a metade dos imigrantes que vieram para o Brasil: na capital paulista há imigrantes de mais de cem nacionalidades diferentes ^{10,11}.

Assim os descendentes destes grupos raciais encontram-se hoje distribuídos de forma geograficamente irregular no país e submetidos a um processo contínuo de miscigenação, característico de nossa população. Nela, nenhum estudo sistemático foi realizado ainda para identificar as alterações estruturais presentes nos genes da globina γ .

Embora os cromossomos humanos e os loci que eles contém sejam idênticos em todos os membros da espécie, as frequências dos alelos em muitos loci variam entre os grupos populacionais, devido à ocorrência de mutações, que é a base da variabilidade genética entre raças e entre suas subpopulações¹².

O estudo das mutações que afetam os genes γ pode acrescentar informações ainda inexistentes sobre nossa população e fornecer dados que possam contribuir na determinação das características genéticas e na origem das diferentes grupos que atualmente compõem a população desta região do Brasil. Além disso, como já mencionado, a análise das variantes e suas repercussões clínicas e hematológicas muito contribui, de uma forma geral, para a compreensão da relação estrutura e função das proteínas¹.



2- OBJETIVOS

Identificar as alterações estruturais dos genes das globinas γ em 34 recém-nascidos de Campinas e região, no sudeste do Brasil, que, ao nascimento, apresentaram Hb F anômala na eletroforese de Hb.

As variantes aqui estudadas foram detectadas durante um programa de triagem neonatal de Hb S realizado no CIPOI-UNICAMP que, no período de 1998 a meados de 2000, analisou cerca de 133.000 RN.



3- CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1

***HbF Campinas [^Aγ^J121(GH4)Glu→Gln],
HbF Joanopolis [^Gγ⁷³(E17) Asp→Ala] and
HbF Paulinia [^Gγ⁸⁰(EF4)Asp→Tyr]:
Three Novel Structural Variants of Fetal Hemoglobin.***

(submetido ao periódico: *Haematologica*)

**Hb F-Campinas [^Aγ121(GH4)Glu→Gln], Hb F-Paulinia [^Gγ80(EF4)Asp→Tyr] and
Hb F-Joanopolis [^Gγ73(E17) Asp→Ala]:
Three Novel Structural Variants of Fetal Hemoglobin**

Denise Faustino Duarte – Postgraduate Student¹, Dulcinéia Martins Albuquerque – Biologist², Pinheiro, V.R.P. – Physician/Hematologist³, Fernando Ferreira Costa – Professor-Clinical Medicine², Maria de Fátima Sonati – PhD-Clinical Pathology¹.

¹Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, State University of Campinas-UNICAMP

²Department of Clinical Medicine, School of Medical Sciences - State University of Campinas-UNICAMP

³Integrated Center for Childhood Oncology-Hematology Investigation–CIPOI - State University of Campinas-UNICAMP

Correspondence: Dr. Maria de Fátima Sonati, Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, State University of Campinas – UNICAMP, P.O.Box 6111, Zip Code 13083-970 – Campinas, São Paulo, Brazil; Phone: +55-19-3788-9453; FAX : +55-19-3788-9434; e-mail: sonati@fcm.unicamp.br

Research supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (grant n° 97/11725-1) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, Brazil.

Running Title: Structural Variants of Fetal Hemoglobin

Abstract

Three new structural variants of Fetal Hemoglobin were detected in newborns during a neonatal screening for Hb S in the Southeast of Brazil: Hb F-Campinas [^Aγ¹121(GH4)Glu→Gln], Hb F-Paulinia [^Gγ⁸⁰(EF4)Asp→Tyr] and Hb F-Joanopolis [^Gγ⁷³(E17) Asp→Ala]. They were not related to clinical abnormalities.

Key Words: Hb structural variants, Fetal Hemoglobin, Brazilian population.

Most of the hemoglobin (Hb) structural variants are known to be caused by single amino acid substitutions in the globin molecule. Many of them are not related to clinical or hematological manifestations because the alterations do not affect neither the stability nor the function of the molecule¹, although they can contribute to a better understanding of the correlation between structure and function of this protein¹. We describe, herein, the occurrence of three novel fetal hemoglobin (Hb F) variants, which we nominated Hb F-Campinas, Hb F-Paulinia and Hb F-Joanopolis. These variants were detected during a neonatal screening program for Hb S, performed at CIPDI-UNICAMP, and their names correspond to the cities, in the southeast of Brazil, from where the respective families originated. Hemoglobin F-Campinas [γ^{121} (GH4) Glu→Gln] was found in a Caucasian male newborn; it migrated between Hb S and Hb C on cellulose acetate electrophoresis, at alkaline pH². Hemoglobin F-Paulinia [γ^{80} (EF4) Asp→Tyr] was detected in an African descendant baby and demonstrated a Hb S-like electrophoretic band. Hemoglobin F-Joanopolis [γ^{73} (E17) Asp→Ala] was encountered in two Caucasian siblings, at different times, and showed an electrophoretic behavior similar to that of Hb F-Campinas. At acid pH², the three variants migrated as normal Hb F. The globin-chain electrophoreses on acrylamide gel, at acid pH², did not show any abnormal chains. Solubility and stability tests² were normal.

The molecular analyses involved the selective amplification of the γ -globin genes by polymerase chain reaction (PCR)³, followed by automated DNA sequencing⁴ by ABI Prism DNA Automated Sequencer, model 377 (Applied Biosystems, Foster City, California), using the "ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing" kit. Hemoglobin F-Campinas is caused by a single base substitution at codon 121 of the γ -globin gene (GAA→CAA), which replaces glutamic acid with glutamine in the γ chain (fig.1a). This mutation results in the lack of the Eco RI restriction site, normally occurring at this codon (fig.2a). Familial analysis revealed that the mother was also a carrier. This is the third description of an alteration at codon 121 of the γ gene; the other two previously described

are Hb F-Siena ($\text{A}\gamma^T$ 121 Glu→Lys) and Hb F-Hull ($\text{A}\gamma$ 121 Glu→Lys), detected in Italians and English babies, respectively, both clinically silent^{5,6}. Hemoglobin F-Campinas is the $\text{A}\gamma$ counterpart of Hb D-Punjab (β 121 Glu→Gln), which co-polymerises with Hb S but has no clinical consequences in the presence of Hb A¹.

Hemoglobin F-Paulinia is due to a base substitution at codon 80 (GAT→TAT) of the $\text{G}\gamma$ gene (fig.1b), causing the replacement of aspartic acid by tyrosine. This substitution was confirmed by MboI digestion (the site normally present was abolished) (fig.2b). The carrier's father was also a heterozygote. This is the second description of mutation at codon 80 of the $\text{G}\gamma$ gene; the previously described variant, Hb F-Marietta ($\text{G}\gamma$ 80 Asp→Asn), was identified in a healthy Caucasian newborn⁷. In the β -globin, there is only one described variant with replacement at this position, normally occupied by asparagine, Hb Szuhu (β 80 Asn→Lys). Although the replacement is located on the 2,3 DPG binding site, functional studies and the clinical presentation of the heterozygotes were normal⁸.

Hemoglobin F-Joanópolis is the result of an alteration at codon 73 (GAT→GCT) of the $\text{G}\gamma$ gene (fig.1c), causing the replacement of aspartic acid by alanine in the correspondent chain; the mutation was confirmed by familial analysis (the mother was also a carrier). This is the first description of mutation at codon 73 of the $\text{G}\gamma$ gene. Other substitutions at the residue 73 that have been described in the $\text{A}\gamma$ chain are Hb F-Xin-Su [$\text{A}\gamma^I$ 73 (E17) Asp→His] and Hb F-Forest Park [$\text{A}\gamma^T$ (E17) Asp→Asn], found in a healthy Chinese newborn and in normal Caucasian babies, respectively^{9,10}. Hemoglobin F-Joanopolis has four analogous mutations in the β -globin gene: Hb Korle-Bu (β 73 Asp→Asn), Hb Vancouver (β 73 Asp→Tyr), Hb Tilburg (β 73 Asp→Gly) and Hb Mobile (β 73 Asp→Val), all with reduced O₂ affinity, but none associated with clinical manifestations in heterozygotes⁸.

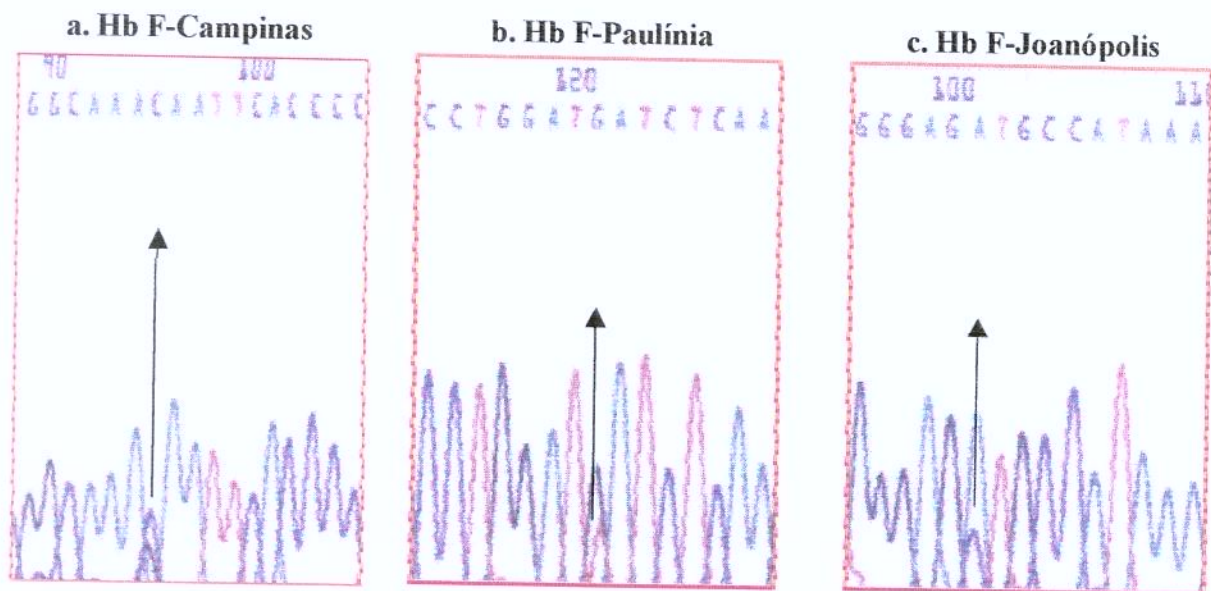


Figure 1- Electropherograms. a) Hb F-Campinas, sequencing of the γ^A -gene showing the mutation at codon 121 (GAA→CAA); b) Hb F-Paulinia, sequencing of the γ^G -gene showing the mutation at codon 80 (GAT→TAT); c) Hb F-Joanópolis, sequencing of the γ^G -gene showing the mutation at codon 73 (GAT→GCT).

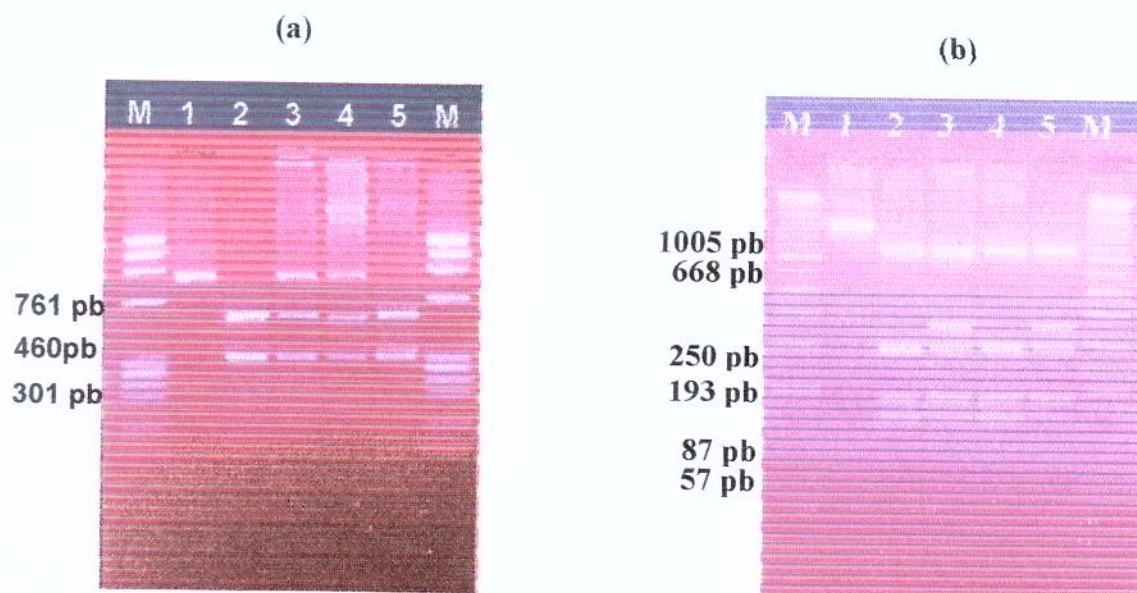


Figure 2- Restriction Analyzes. a) with Eco RI enzyme, being 1- undigested normal control (one fragment of 761 bp); 2- digested normal control (fragments of 460 and 301 bp); 3 e 4- Hb F-Campinas newborn and mother, respectively (fragments of 761, 460 and 301 bp, showing the lack of Eco RI site in heterozygosis), and 5- father (normal); b) with MboI enzyme, being 1- undigested control (one fragment of 1005 bp); 2- digested normal control (fragments of 668, 193, 87 and 57 bp); 3 and 5- Hb F-Paulinia newborn and father, respectively, showing the 250 bp extra fragment corresponding to the lack of the MboI site between the 193 and 57 bp fragments; and 4- mother (normal).

The carriers of the three variants described here did not present any clinical abnormalities, and the hematological data were all normal, suggesting that the residue replacements did not compromise the stability or the function of the molecule. However, as functional studies could not be performed, this may also be due to the low proportion of the variant in the total Hb, not enough to cause significant alterations.

Regarding globin-chain synthesis, these mutations seem not modify the expression of the affected γ -genes, since all the adult family carriers showed Hb F levels below 1%.

Acknowledgments- We thank Elza M. Kimura and Sirley A. Gervásio of the Diagnostic Hematological Laboratory of the Department of Clinical Pathology, State University of Campinas-UNICAMP, for technical help, and to Dr. Nicola Conran, for the English review of this communication.

References

- 1- Bunn, H.F. and Forget, B.G.: Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects, W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, USA, 1986.
- 2- Dacie, J.V. and Lewis, S.M.: Practical Haematology, 8th edition, Churchill Livingstone, London, England, 1995.
- 3- Losekoot, M., Fodde R., Giordano, P.C., and Bernini, L.F.: A novel δ^0 - thalassemia arising from a frameshift insertion, detected by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. Hum. Genetic 1989; 83:75-8.
- 4- Sanger, F., Nickelen, S., and Coulson, A R.: DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 74:5463-67.
- 5- Care, A, Marinucci, M., Massa, A, Maffi, D., Sposi, N.M., Improta , T., and Tentori, L.: HbF-Siena ($\alpha_2^A\gamma^T_{2121}(\text{GH4})\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}$). A new fetal hemoglobin variant. Hemoglobin 1983; 7:79-83.
- 6- Sacker, L.S., Beale, D., Black, AJ. Huntsman, H., Lorkin PA.: Haemoglobin F-Hull (γ_{121} glutamic acid $\rightarrow$ lysine), homologous with haemoglobins O and O-Indonesia. Br. Med. J. 1967; 3:531-33.
- 7- Nakatsuji, T., Lam, H., Wilson, J.B., Webber, B.B., and Huisman, T.H.J.: Hb F-Marietta, or $\gamma^{\text{I}80}(\text{EF4})\text{Asp}\rightarrow\text{Asn}$, observed in a Caucasian baby. Hemoglobin 1982; 6:407-11.
- 8- Globin Gene Server Web Site (<http://globin.cse.psu.edu>).
- 9- Ma, M., Hu, H., Kutlar, F., Wilson, J.B., Huisman, T.H.J.: Hb F-Xin-Su or $\gamma^{\text{I}73}(\text{E17})\text{Asp}\rightarrow\text{His}$: a new slow-moving fetal hemoglobin variant. Hemoglobin 1987; 11(5): 473-79.
- 10- Chen, S.S., Webber, B.B., Wilson, J.B., Huisman, T.H.J.: Hb F-Forest Park, a new γ variant with two amino acid substitutions, 75(E19) Ile $\rightarrow$ Thr and 73 (E17) Asp $\rightarrow$ His, which can be identified in adults by gene-mapping analysis. Biochim Biophys Acta 1985; 832(3): 242-47.

CAPÍTULO 2

Structural Alterations of the Gamma-Globin Genes in a Brazilian Population

(aceito para publicação no periódico *Hemoglobin* em 22/09/2003)

Structural Alterations of the Gamma-Globin Genes in a Brazilian Population

Duarte, D.F.¹, Kimura, E.M.¹, Albuquerque, D.M.², Pinheiro, V.R.P.³, Costa F.F.², Sonati M.F.¹

¹Department of Clinical Pathology – School of Medical Sciences - State University of Campinas-UNICAMP

²Department of Clinical Medicine, School of Medical Sciences - State University of Campinas-UNICAMP

³Integrated Center for Childhood Oncology-Hematology Investigation - CIPOI - State University of Campinas-UNICAMP

Running Title: γ -Globin Gene Alterations

Correspondence to: Dr. Maria de Fátima Sonati, Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, State University of Campinas – UNICAMP, P.O. Box 6111, Zip Code 13083-970 – Campinas, São Paulo, Brazil; Phone: +55-19-3788-9453; FAX : +55-19-3788-9434; E-Mail sonati@fcm.unicamp.br

Key words: gamma-globin genes, fetal hemoglobin, hemoglobin structural variants, Brazilian population.

The γ -globin genes are duplicated ($^G\gamma$ and $^A\gamma$, depending on glycine or alanine at position 136 of the γ -globin chain) and are located in the β -globin gene cluster, on the short arm of chromosome 11 (11p15.5). They are responsible, together with the α -genes, for the production of Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) during the fetal period of human development. Most of the Hb F structural variants are caused by single amino acid replacements in the γ -globin molecule, resultant from single base substitutions in the DNA sequences of the correspondent genes [1].

Ninety-nine mutations have so far been described, 45 in the $^A\gamma$ -gene and 54 in the $^G\gamma$ -gene, most of them causing abnormal Hb F with no clinical or hematological manifestations in the carriers [2]. As the γ -genes become silent 6 months post-birth, mutations in these genes are less investigated than those in the α or β -globin genes. However, studies on Hb F variants have contributed to a better understanding of the relationship between the structure and function of proteins and, besides, mutations in the γ -globin genes may also be used as genetic markers for populations [1,3].

We determined the molecular bases of the Hb F variants found in 34 unrelated newborns from Campinas region, Southeastern Brazil, based on electrophoresis on cellulose acetate, at alkaline pH. The anomalous Hbs F were detected during neonatal screening for Hb S, carried out at CIPOL-UNICAMP, among 133,000 newborn babies examined during a period of 30 months (from 1998 to 2000).

Nine variants were identified among the 34 babies, and were always in heterozygosis: 3 were novel (Hb F-Campinas, Hb F-Paulínia, and Hb F-Joanópolis) (data to be published) and 6 had already been found in other populations (Hb F-Carlton, Hb F-Dickinson, Hb F-Port Royal, Hb F-Pendergrass, Hb F-Yamaguchi and Hb F-Urumqi) [4-10]. They were confirmed in our laboratory by electrophoresis on cellulose acetate, at alkaline pH, and on agar gel, at acid pH, and checked regarding their solubility and stability properties [11]. The abnormal chain was separated by denaturing electrophoresis on

acrylamide gel, at acid pH [12]. The affected γ -gene ($^G\gamma$ or $^A\gamma$) was selectively amplified by polymerase chain reaction (PCR) with primers and conditions described elsewhere and sequenced in an ABI Prism DNA automated sequencer, model 377 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), using the “ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing” kit [13-18]. Mutations were confirmed by restriction analyses, when possible, and by sequencing the opposite strand and familial analyses. Data regarding the variants, their molecular bases and babies’ descent are summarized in Table 1. Solubility and stability tests were all normal, as well as the newborn babies’ hematological parameters, electronically determined (Cobas Argos – 5 Diff, ABX – Horiba).

Hb F-Campinas [$^A\gamma$ 121 Glu→Gln], Hb-F Paulínia [$^G\gamma$ 80 Asp→Tyr] and Hb-F Joanópolis [$^G\gamma$ 73 Asp→Ala] were found in a Caucasian baby, in an African descendant newborn and in two Caucasian siblings, respectively (data to be published).

Hemoglobin F-Carlton [$^G\gamma$ 121 Glu→Lys] was detected here in 13 newborns (38%), most of them of Italian descent, in agreement with its first description, in an Italian baby [4].

Hemoglobin F-Dickinson [$^A\gamma^T$ 97 His→Arg], identified in 7 cases (21%), was previously found in a few babies of English, Irish and America-Indian origin [5]. The carriers encountered here were of Portuguese, Spanish, African and Native Indian descent. One of them was represented by a *de novo* mutation, confirmed by paternity tests.

The variant Hb F-Port Royal [$^G\gamma$ 125 Glu→Ala] was also detected in 7 newborn babies (21%), of Italian, Spanish, German, African and Native Indian descent. It was first described in the Black population and was believed to be the result of a rearrangement between $^G\gamma$ -genes ($^G\gamma^G\gamma$ -duplication) [6]. More recently, it was demonstrated that it is rather the result of two nucleotide changes in the same $^A\gamma$ -gene (125 Glu→Ala, GAG→GCG; 136 Ala→Gly, GCA→GGA), producing a $^G\gamma$ -chain with an abnormally low level of around 14-15% [19].

Hemoglobin F-Pendergrass [$\text{A}\gamma^{36} \text{Pro} \rightarrow \text{Arg}$] was identified in 2 carriers, of Portuguese and Spanish descent; and was previously found in a Caucasian baby [7].

Hemoglobin F-Yamaguchi [$\text{A}\gamma^{\text{T}} 80 \text{Asp} \rightarrow \text{Asn}$] is encountered in Japanese babies. The mutation occurred in an $\text{A}\gamma^{\text{T}}$ allele (threonine instead of isoleucine at position 75) and it was the first $\text{A}\gamma^{\text{T}}$ variant to be discovered [8]. This abnormal Hb F may be associated with $\text{G}\gamma$ -thalassemia, caused by a deletion of about 5kb, which probably resulted from an unequal crossing over between $\text{G}\gamma$ and $\text{A}\gamma$ genes, leading to the formation of a $\text{G}\gamma^{\text{A}}$ -hybrid gene [9].

The variant Hb F-Urumqi [$\text{G}\gamma^{22} \text{Asp} \rightarrow \text{Gly}$] was found here in an African descendant baby, although it was previously described in a Chinese newborn [10].

The first 3 variants (Hb F-Carlton, Hb F-Dickinson and Hb F-Port Royal) constituted 80% of the cases (13, 7 and 7, respectively), being sometimes detected in individuals with different ethnical backgrounds to those in which they were previously found. The genotype frequency of the 3 variants together was of 0,0203%, i.e., lower than 1%, but it is probable that they reach polymorphic frequencies in some other populations, perhaps less miscegenated than ours, since the mutations seem not be negatively selected.

The DNA sequence changes of these anomalous Hbs F were previously deduced by computer and are now experimentally determined. To our knowledge, this is the first report of γ -globin gene structural alterations in a Brazilian population and reflects its highly mixed origin. As the variants were selected based only on the electrical charge modifications, it is very probable that some others, electrophoretically silent due to neutral-to-neutral substitutions, can also be present in this population.

Acknowledgments: We thank Sirley A. Gervásio of the Diagnostic Hematological Laboratory of the Department of Clinical Pathology, State University of Campinas-UNICAMP, for technical help, and to Dr. Nicola Conran, for the English review of this communication. Research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (grant nº 97/11725-1) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES/ Brazil.

Table 1 - Gamma-Globin Gene Structural Variants Detected in 34 Brazilian Babies

Variant	Electrophoretic migration at alkaline pH	Mutation	Restriction Enzyme	Descendants	nº of cases
Hb F- Carlton	slower than Hb C	^G γ121 Glu→Lys (<u>G</u> AA→ <u>A</u> AA)	Eco R I	I	13
Hb F-Dickinson	between Hbs S and C	^A γ97 His→Arg (<u>C</u> AT→ <u>C</u> GT)	Nla III	P, S, A, N (*)	07
Hb F- Port Royal	between Hbs S and C	^G γ125 Glu→Ala (<u>G</u> AG→ <u>G</u> CG)	Dde I/ Pst I	I, S, G, A, N (*)	07
Hb F-Pendergrass	Hb S-like	^A γ36 Pro→Arg (<u>C</u> CA→ <u>C</u> GA)	Nco I	P, S (*)	02
Hb F-Yamaguchi	between Hbs S and C	^A γ ^T 80 Asp→Asn (<u>G</u> AT→ <u>A</u> AT)	Mbo I	Japanese	01
Hb F-Urumqi	between Hbs S and C	^G γ22 Asp→Gly (<u>G</u> AT→ <u>G</u> GT)	Mbo II	A (*)	01
Hb F-Campinas	between Hbs S and C	^A γ121Glu→Gln (<u>G</u> AA→ <u>C</u> AA)	Eco R I	Not informed	01
Hb F-Paulinia	Hb S-like	^G γ 80 Asp→Tyr (<u>G</u> AT→ <u>T</u> AT)	Mbo I	A (*)	01
Hb F-Joanópolis	between Hbs S and C	^G γ73 Asp→Ala (<u>G</u> AT→ <u>G</u> CT)	-	Not informed	01

(*) I = Italian; P = Portuguese; S = Spanish; G = German; A = African; N = Native Indian

REFERENCES

- 1- Bunn, H.F. and Foget, BG: Hemoglobin Molecular, Genetic and Clinical Aspects. WB Saunders Company, Philadelphia, PA, USA, 1986.
- 2- Web Site of the Globin Gene Server (<http://globin.cse.psu.edu>) (accessed September 2003)
- 3- Wajcman, H.; Préhu, C.; Bardakdjian-Michau, J.; Promé, D.; Riou, J.; Godard, C.; Mathis, M.; Hurtrel, D.; Galactéros, F. Abnormal Hemoglobins: Laboratory Methods, Hemoglobin **2001**, 25(2), 169-181.
- 4- Brennan, S.^o; Smith, M.B.; Carrell, R.W. Haemoglobin F-Melbourne $\text{G}\gamma 16 \text{ Gly} \rightarrow \text{Arg}$ and Haemoglobin F-Carlton $\text{G}\gamma 121 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$ Further Evidence for Varied Actiity of γ -Chain Genes. Biochim. Biophys. Acta **1977**, 490, 452-455.
- 5- Schneider, R.G.; Haggard, M.E.; Gustavson, L.P.; Brimhall, B.; Jones, R.T. Genetic Haemoglobin Abnormalities in about 9000 Black and 7000 White Newborns; Haemoglobin F-Dickinson ($\text{A}\gamma 97 \text{ His} \rightarrow \text{Arg}$), a New Variant. Br. J. Haematol. **1974**, 28, 515-524.
- 6- Brimhall, B.; Vedvick, T.S.; Jones, R.T. Hemoglobin F-Port Royal ($\alpha_2 \text{G}\gamma_2^{125 \text{ Glu} \rightarrow \text{Ala}}$). Br. J. Haematol. **1974**, 27, 313-318.
- 7- Chen, S.S.; Wilson, J.B.; Huisman, T.H.J. Hb F-Pendergrass, and $\text{A}\gamma^{\text{I}}$ variant with a Pro $\rightarrow$ Arg substitution at position $\gamma 36$ (C3), Hemoglobin **1985**, 9, 73-77.
- 8- Fuyuno, K.; Torigoe, T.; Ohba, Y.; Matsuoka, M.; Miyaji, T. Survey of cord blood hemoglobin and two new γ chain variants. Hemoglobin **1981**, 5, 139-151.
- 9- Nakatsuji, T.; Ohba, Y.; Huisman, T.H.J. Hb F-Yamaguchi ($\gamma 75 \text{ THR}$, $\gamma 80 \text{ ASN}$, $\gamma 136 \text{ ALA}$) is Associated with $\text{G}\gamma$ -Thalassemia. Am. J. Hematol. **1984**, 16, 189-192.

- 10- Hu, H.; Ma, M. Hb F-Urumqi $G_{\gamma}I$ 22 (B4) Asp→Gly: A new Fetal Hemoglobin Variant Found in a Uygur Baby. *Hemoglobin* **1986**, 10(1), 15-20.
- 11- Dacie, J.V. and Lewis, S.M.: *Practical Haematology*. 8th edition, Churchill Livingstone, London, England, 1995.
- 12- Alter, B.P.; Goff, S.C.; Efremov, G.D.; Gravely, M.E.; Huisman, T.H.J. Globin chain electrophoresis: a new approach to the G_{γ}/A_{γ} ratio of globin synthesis. *Br. J. Haematol.* **1980**, 44, 527-534.
- 13- Losekoot, M.; Fodde, R.; Giordano, P.C.; Bernini, L.F. A novel δ^0 -thalassemia arising from a frameshift insertion, detected by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *Hum. Genet.* **1989**, 83, 75-78.
- 14- Darleen, R.; Pawors, M.D. β^S Gene Cluster Haplotypes in Sickle Cell Anemia. *Hematol.Oncol. Clin. of North America* **1991**, 5(3), 475-487.
- 15- Plaseska, D.; Popovska, P.S.; Lazarevski, M.; Efremov, G.D. Hb F-Macedonia II $G_{\gamma}104$ (G6) Lys→Asn a New γ Chain Variant. *Hemoglobin* **1994**, 18(6), 373-382.
- 16- Plaseska D, Cepreganova-Krstik B, Momirovska A, Efremov GD: Hb F Macedonia I or $\alpha_2\gamma_2$ 2(NA2) His→Gln. *Hemoglobin* **1994**, 18(3), 241-245.
- 17- Pobedinskaya, D.D.; Molchanova, T.P.; Huisman, T.H.J. Hb-F Sacromonte or $\alpha^{2G}\gamma^2$ 59(E3) Lys→Gln Observed In a Spanish Newborn and his Mother. *Hemoglobin* **1993**, 17(3), 269-274.
- 18- Kumar, M.K.; Zwerdling, T.; Rucknagel, D.L. Hemoglobin F-Cincinnati, $\alpha_2^G\gamma_2$ 41(C7) Phe→Ser in a Newborn with Cyanosis. *Am. J. Hematol.* **1995**, 49, 43-47.
- 19- Huisman, T.H.J. Gamma Chain Abnormal Fetal Hemoglobin Variants. *Am. J. Hematol.* **1997**, 55, 159-163.



4- CONCLUSÃO GERAL



Mutações que afetam os genes γ são as causas do surgimento de variantes estruturais da Hb Fetal. Boa parte delas é clínica e hematologicamente silenciosa, não causando alteração na função ou na estabilidade da molécula¹.

No presente trabalho foram determinadas as bases moleculares das alterações estruturais das cadeias γ presentes em 34 recém nascidos que, submetidos a um programa de triagem neonatal para Hb S realizado no CIPOI – UNICAMP, apresentaram um padrão eletroforético anômalo em pH alcalino. Elas foram detectadas em um total de aproximadamente 133.000 RNs analisados em um período de 30 meses.

Todas as variantes foram inicialmente submetidas a testes complementares (eletroforese em gel de ágar e de cadeias globínicas, em pH ácido, e testes de solubilidade e estabilidade), e caracterizadas por análise molecular, que envolveu as técnicas de PCR, seqüenciamento de DNA, análise com enzimas de restrição, quando possível, e análise familiar¹³⁻²².

Nove variantes foram identificadas, sendo três novas [Hb F-Campinas ($^A\gamma 121$ Glu→Gln), Hb-F Paulínia ($^G\gamma 80$ Asp→Tyr) e Hb-F Joanópolis ($^G\gamma 73$ Asp→Ala)], e seis previamente descritas em outras populações: Hb F-Carlton ($^G\gamma 121$ Glu→Lys), Hb F-Dickinson ($^A\gamma^T 97$ Hist→Arg), Hb F-Port Royal ($^G\gamma 125$ Glu→Ala), Hb F-Pendergrass ($^A\gamma 36$ Pro→Arg), Hb F-Yamaguchi ($^A\gamma^T 80$ Asp→Asn) e Hb F-Urumqi ($^G\gamma 22$ Asp→Gly)²³⁻²⁸.

Nenhum dos RNs apresentou manifestações clínicas ou hematológicas, seja porque as substituições aqui ocorridas não afetaram as regiões importantes de contato entre as cadeias α/γ ou entre globinas e os grupos heme, não comprometendo a estabilidade ou a função da molécula, seja porque a proporção de Hb anômala formada não foi suficiente para levar a manifestações perceptíveis ou detectáveis. Isso se deve à duplicação $^G\gamma - ^A\gamma$ e às diferentes proporções de cadeias sintetizadas ($^G\gamma = 35\%$ e $^A\gamma = 15\%$) sob o comando desses genes¹.

De nosso conhecimento, esse foi o primeiro estudo realizado para a caracterização molecular das variantes estruturais de cadeias γ presentes em uma população brasileira. Dentre as encontradas, a mais freqüente foi a Hb F-Carlton (38%), seguida das Hbs F-Dickinson (21%) e F-Port Royal (21%), mas, em todos os casos, houve portadores com origens étnicas diferentes dos primeiros portadores descritos. A Hb F-Urumqi, por exemplo, foi previamente descrita em um RN de origem chinesa, e aqui detectada em RN de origem africana²⁸.

Embora aqui idiomórficas, essas mutações podem constituir polimorfismos genéticos relacionados aos genes γ em populações com menor grau de mistura racial. A variabilidade encontrada (9 diferentes variantes em 34 indivíduos) reflete o grande número de grupos étnicos que formam a população brasileira e, em especial, esta região do país.

Não se pode excluir, no entanto, a possibilidade de que estas mutações estejam ocorrendo de forma independente nas populações, uma vez que não há, pela ausência de conseqüências clínicas, seleção negativa contra elas. De fato, um dos casos de Hb F- Dickinson aqui encontrado era uma caso de *mutação de novo*, já que o teste de paternidade comprovou a relação biológica. Também ilustram essa possibilidade as 3 variantes novas aqui descritas.

No caso da Hb F-Campinas, por exemplo, a mutação análoga no gene β resulta na Hb D Punjab [β 121 Glu→Gln], variante que alcança elevadas prevalências em várias das populações estudadas^{1,29-32}. Restaria saber se o efeito da associação da Hb F-Campinas com a HbS seria o mesmo daquele observado com a Hb D Punjab, ou seja, de copolimerização, o que poderia levar a manifestações clínicas precoces em seus portadores. Similarmente, a Hb F-Joanópolis tem mutações análogas no gene β : as Hbs Korle-Bu (β 73 Asn), Vancouver (β 73 Tir), Tilburg (β 73 Gli) e Mobile (β 73 Val), que reduzem a afinidade pelo oxigênio (O_2). Nenhuma delas, no entanto, está associada a alterações clínicas ou hematológicas nos heterozigotos²⁹⁻³⁶.

Os resultados do presente trabalho são de particular interesse para a área de genética de populações, uma vez que revelam quais mutações afetando os genes γ se encontram presentes em nossa população; para a Bioquímica, já que várias delas (Hb F-Carlton, F-Dickinson, F-Port Royal, F-Pendergrass e F-Urumqi) estão sendo caracterizadas ao nível molecular pela primeira vez; e para a hematologia laboratorial, com a demonstração de que, embora raras, há variantes de Hb F com carga elétrica e migração eletroforética similar às Hbs S e C distribuídas em nossa população^{24-26,28}.

Cumprе salientar que o método de triagem aqui empregado permitiu a detecção apenas daquelas variantes cuja substituição de aminoácidos modificou a carga elétrica final da proteína. Hemoglobinas anômalas causadas por substituições neutras não foram diferenciadas, sendo assim possível que um número maior de variantes de Hb F estejam presentes na população brasileira.



5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- BUNN, H.F. and FORGET, B.G.: **Hemoglobin Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. Philadelphia, PA, USA, W.B. Saunders Company, 1986.
- 2- DICKERSON, R.E. & GUEISS, I.: **Hemoglobin**. London: Benjamin Cummings Publishers, 1983.
- 3- BURTIS, C.A , ASHWOOD,E.R. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. 3rd ed. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, W.B. Saunders Company, 1999.
- 4- MEIRELLES, C.M., CZELUSNIAK, J., SCHNEIDER, M.P.C. e GOODMAN, M. **Série Monografias - Hemoglobina Fetal: Estrutura, Expressão e Evolução do Gene Gama em Primatas (Primates, Platyrrhini)**. SBG, Ribeirão Preto,SP, Brasil, 1998.
- 5- GIORDANO, P.C.: **Hemoglobinopathieen in Nederland: Diagnostiek, epidemiologie en preventie**. Tese de Doutorado, 1998.
- 6- WAJCMAN, H., PRÉHU, C., BARDAKDJIAN-MICHAU, J., PROMÉ, D., RIOU, J., GODARD, C., MATHIS, M., HURTREL, D., GALACTÉROS, F. Abnormal Hemoglobins: Laboratory Methods. **Hemoglobin**, 25(2):169-81, 2001.
- 7- <http://globin.cse.psu.edu/cgi-bin/hbvar/>
- 8- HUISMAN, T. H. J., JONXIS, J. H. P. **The Hemoglobinopathies Techniques of identification**. New York , NY USA, Clinical and Biochemical Analysis, Vol.6, 1977.
- 9- AZEVEDO, E. S., SILVA, M. C. B. O., LIMA, A. M. U. M., FORTUNA, C. M. M., SANTOS, M.G., Genetic and anthropological studies in the Island of Itaparica Bahia, Brazil, **Hum Hered**, 31: 353-57, 1981.
- 10- http://www.filomenamatarazzo.com.br/indios_formação
- 11- http://www.filomenamatarazzo.com.br/imi_atual.htm

- 12- THOMPSON, M.W., MCLNNES, R. R., WILLARD, H. F. **Genética Médica**. 5º ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1993.
- 13- DACIE, J.V. and LEWIS, S.M. **Practical Haematology**, 8th edition, London, England Churchill Livingstone, 1995.
- 14- ALTER, B. P., GOFF, S. C., EFREMOV, G. D., GRAVELY, M. E. and HUISMAN, t.H. J. Globin chain electrophoresis: a new approach to the $^G\gamma/^A\gamma$ ratio of globin synthesis. **Br J Haematol**, 44:527-34,1980.
- 15- PEMBREY, M.E., MACWADE, P., and WEATHERALL, D.J. Reliable routine estimation of small amounts of fetal haemoglobin by alkali denaturation. **J Clin Pathol**, 25:738-40, 1972.
- 16- LOSEKOOT, M., FODDE, R., GIORDANO, P. C., and BERNINI, L. F. A novel $\delta\alpha$ - thalassemia arising from a frameshift insertio, detected dy direct sequencing of enzymatically amplified DNA. **Hum Genet**,83:75-78, 1989.
- 17- DARLEEN, R., PAWORS, M.D. β^S Gene Cluster Haplotypes in Sickle Cell Anemia. **Hematol Oncol Clin of North America**, 5(3):475-487,1991.
- 18- PLASESKA, D., POPOVSKA, P.S., LAZAREVSKI, M. and EFREMOV, G.D. Hb F-Macedonia II $^G\gamma$ 104 (G6) Lys→Asn a New γ Chain Variant. **Hemoglobin**, 18 (6):373-382, 1994.
- 19- PLASESKA, D., CEPREGANOVA-KRSTIK, B., MOMIROVSKA, A., EFREMOV, G.D. Hb F-Macedonia I or $\alpha^2\gamma^2$ 2(NA2) His→Gln. **Hemoglobin**,18(3): 241-245, 1994.
- 20- POBEDIMSKAYA, D. D., MOLCHANOVA, T. P., HUISMAN, T. H. J. Hb F-Sacromonte or $\alpha^{2G}\gamma^2$ 59(E3) Lys→Gln Observed In a Spanish Newborn and his Mother. **Hemoglobin**, 17(3): 269-74, 1993.

- 21- KUMAR, M.K., ZWERDLING, T. and RUCKNAGEL, D.L. Hemoglobin F-Cincinnati, $\alpha_2^G \gamma_2^{41(C7)}$ Phe→Ser in a Newborn with Cyanosis. **Am J Hematol**, 49: 43-47, 1995.
- 22- SANGER, F., NICKELLEN, S., and COULSON, A R. DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**, 74:5463-5467, 1991.
- 23- BRENNAN, S. O., SMITH, M. B., CARRELL, R. W. Haemoglobin F-Melbourne γ^{16} Gly→Arg and Haemoglobin F-Carlton γ^{121} Glu→Lys Further Evidence for Varied Activity of γ -Chain Genes. **Biochim Biophys Acta**, 490: 452-455, 1977.
- 24- SCHNEIDER, R. G., HAGGARD, M. E., GUSTAVSON, L. P., BRIMHALL, B., JONES, R.T. Genetic Haemoglobin Abnormalities in about 9000 Black and 7000 White Newborns. Haemoglobin F-Dickinson (γ^{97} His→Arg), a New Variant. **Br J Haematol**, 28: 515-24, 1974.
- 25- BRIMHALL, B., VEDVICK, T.S., JONES, R. T. Hemoglobin F-Port Royal ($\alpha_2^G \gamma_2^{125}$ Glu→Ala). **Br J Haematol**, 27: 313-18, 1974.
- 26- CHEN, S.S., WILSON, J.B., HUISMAN, T.H.J. Hb F-Pendergrass, and γ^I variant with a Pro→Arg substitution at position γ^{36} (C3). **Hemoglobin**, 9: 73-77, 1985.
- 27- FUYUNO, K., TORIGOE, T., OHBA, Y., MATSUOKA, M., MIYAJI, T. Survey of cord blood hemoglobin and identified two new γ chain variants. **Hemoglobin** 5: 139-51, 1981.
- 28- HU, H., MA, M. Hb F-Urumqi γ^I 22(B4) Asp→Gly: A new Fetal Hemoglobin Variant Found in a Uygur Baby. **Hemoglobin**, 10(1): 15-20, 1986.
- 29- FUCHAROEN, S., CHANGTRAKUN, Y., SURAPOT, S., FUCHAROEN, G., SANCHAISURIYA, K.: Molecular characterization of Hb D-Punjab [β^{121} (GH4) Glu→Gln] in Thailand. **Hemoglobin**, 26 (3): 261-69, 2002.

- 30- ADACHI, K., KIM, J., BALLAS, S., SURREY, S., ASAKURA, T.: Facilitation of Hb S Polymerization by the substitution of Glu for Gln at β 121. **J Bio Chem** 263 (12): 5607-10, 1988.
- 31- Konotey-Ahulu, F.I., GALLO, E., LEHMAN, H., RINGELHANN, B.: Hemoglobin Korle-Bu (beta 73 aspartic acid replaced by asparagine) showing one of the two amino acid substitutions of haemoglobin C Harlem. **J Med Genet**, 5(2): 107-111, 1968.
- 32- NAGEL, R. L., LIN, M. J., WITKOWSKA, H. E., FABRI, M. E., BESTAK, M., HIRSCH, R. E.: Compound heterozygosity for hemoglobin C and Korle-Bu: moderate microcytic hemolytic anemia and acceleration of crystal formation. **Blood**, 82(6): 1907-12, 1993.
- 33- JONES, R. T., BRIMHALL, B., POOTRAKUL, S., GRAY, G.: Hemoglobin Vancouver [α 2 β 2 (73) (E17) Asp replaced by tyr]: its structure and function. **J Mol Evol**, 9 (1): 37-44, 1976.
- 34- GRAY, F.R., MARION, R.B.: Clinical and hematological studies in a family with hemoglobin Vancouver. **Hemoglobin**, 2 (2): 143-52, 1978.
- 35- BERNINI, L.H., GIORDANO, P.C.: Hemoglobin Tilburg: α 2 β 2 73 (E17) Asp→Gly. A new hemoglobin with reduced oxygen affinity. **Biochim Biophys Acta**, 957 (2): 281-85, 1988.
- 36- SCHNEIDER, R.G., HOSTY, T.S., TOMLIN, G., ATKINS, R., BRIMHALL, B., JONES, R.T.: Hb Mobile [α 2 β 2 73 (E17) Asp replaced by Val]: a new variant. **Biochem Genet**, 13 (7): 411-15, 1975.