

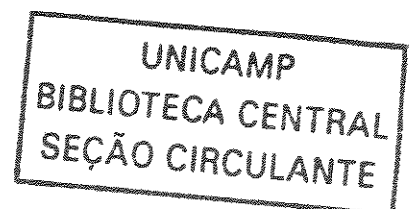
Tiago Gomes de Andrade

**ANÁLISE MOLECULAR DE DEFICIÊNCIAS GÊNICAS
ASSOCIADAS À PERSISTÊNCIA HEREDITÁRIA DE
HEMOGLOBINA FETAL E DELTA BETA
TALASSEMIAS**

2003.01339

Campinas, 2002

i



Tiago Gomes de Andrade

**ANÁLISE MOLECULAR DE DEFICIÊNCIAS GÊNICAS
ASSOCIADAS À PERSISTÊNCIA HEREDITÁRIA DE
HEMOGLOBINA FETAL E DELTA BETA TALASSEMIAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

Campinas, 2002

Apoio: FAPESP e Hemocentro-Unicamp

CHAMADA UNICAMP
An24a

EX

OMBO BC/ 52711

ROC. 16-124703

C ☐ D ☒

REÇO R\$ 11,00

DATA 15/03/03

13 CPD

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

CM00180993-6

BIB ID 284951

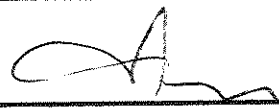
An24a Andrade, Tiago Gomes de
Análise molecular de deficiências gênicas associadas à persistência hereditária de hemoglobina fetal e delta beta talassemias. / Tiago Gomes de Andrade. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Fernando Ferreira Costa
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Talassemia. 2. Anemia falciforme. 3. Hemoglobina fetal. 4. Genética molecular. I. Fernando Ferreira Costa. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): *Prof.Dr. Fernando Ferreira Costa*

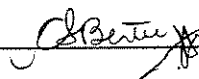


Membros:

Profa.Dra. Sandra de Fátima Menossi Gualandro



Profa .Dra. Carmen Silvia Bertuzzo



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 21.02.2002

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, pela receptividade, orientação, confiança e estímulo nas atividades desenvolvidas neste período de Mestrado;
- Aos colegas do Laboratório de Terapia Gênica, Biologia Molecular e Genoma, do Hemocentro- Unicamp, pelo companheirismo e colaboração;
- À Dr. Maria de Fátima Sonati, Sirley e Laudicéia, do Departamento de Patologia Clínica (Unicamp), que contribuíram com fornecimento de material para nossa pesquisa (sangue de alguns indivíduos detectados com Hb F elevada, no rastreamento para alterações das hemoglobinas, do Hospital das Clínicas – Unicamp);
- À Dr. Cristine Haeckel, Clarisa Fernandes Ramos e também à Juliana Martins, pela receptividade e sugestões;
- Aos portadores dos distúrbios Talassêmicos e Falcêmicos, que são “objeto e objetivo” desta linha de pesquisa, e àqueles que doaram sangue;
- Aos amigos Daniel, Beto e Alexandre;
- À Luciana, pelo amor, carinho e “paciência” , que tornaram estes dois anos mais fáceis;
- À minha família, pelo apoio, e, sem a qual, nada disto seria possível;
- À Vida, que me deu oportunidade de experimentar mais um período de amadurecimento.

*A todos aqueles que possam, de alguma forma,
beneficiar-se dos resultados deste trabalho e desta
linha de pesquisa.*

SUMÁRIO

RESUMO.....	xii
1 – INTRODUÇÃO.....	15
1.1 – Expressão gênica no cluster da beta-globina.....	16
1.2 – Alterações das hemoglobinas.....	17
1.2.1 - Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal.....	17
1.2.2 - Delta-beta Talassemias.....	19
1.2.3 - Origem das deficiências gênicas.....	20
1.2.4 - Efeito das deficiências gênicas.....	20
2 – OBJETIVOS.....	22
3 - CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	24
3.1 – Casuística.....	25
3.2 – Métodos	27
3.2.1 - Dados hematológicos	27
3.2.2 - Extração do DNA.....	28
3.2.2.1 - Fenol.....	28
3.2.2.2 - Kit Amershan- Pharmacia para extração de DNA genômico.....	28
3.2.3 – Detecção de deleções conhecidas por PCR.....	28
3.2.4 - Identificação das deleções em gel de agarose.....	31
3.2.5 - Detecção de novas deleções.....	31
3.2.5.1 - Determinação da fase exponencial da reação.....	32
3.2.5.2 –PCR Multiplex.....	33

3 . 2 . 5 . 3 - Análise.....	35
3 . 2 . 5 . 4 - Amplificação do ponto de quebra.....	36
3 . 2 . 6 - Sequenciamento e análise do ponto de quebra das deleções	36
3 . 2 . 6 . 1 – PCR.....	36
3 . 2 . 6 . 2 – Tratamento.....	36
3 . 2 . 6 . 3 – Sequenciamento.....	37
3 . 2 . 6 . 4 – Purificação.....	37
3 . 2 . 6 . 5 – Leitura.....	37
3 . 2 . 6 . 6 – Análise.....	37
4 - RESULTADOS.....	38
4 . 1 – Detecção de deleções conhecidas.....	39
4 . 2 – Detecção de novas deleções.....	44
5 – DISCUSSÃO.....	51
6 – CONCLUSÕES	58
7 - SUMMARY.....	60
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

SUMÁRIO DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Dados hematológicos dos indivíduos estudados.....	25
Tabela 2: Dados hematológicos das famílias dos pacientes 1 e 2.....	26
Tabela 3: Relação de iniciadores utilizados para amplificar as deleções de PHHF e ($\delta\beta$) ^o - Talassemia Siciliana e Espanhola.....	29
Tabela 4: Parâmetros utilizados nas reações de PCR para detecção de deficiências gênicas conhecidas.....	31
Tabela 5: Primers marcados com 6-FAM para rastreamento de deleções no cluster da β -globina.....	33
Tabela 6: Iniciadores que formam Multiplex I.....	34
Tabela 7: Iniciadores que formam Multiplex II.....	34
Tabela 8: Iniciadores que formam Multiplex III.....	34
Tabela 9: Iniciadores utilizados nas reações com Elongase.....	36
Figura 1: Esquema da disposição dos genes e alguns elementos regulatórios no cluster da β -globina.	17
Figura 2: Disposição de deleções que originam Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal e ($\delta\beta$) ^o Talassemias.....	19
Figura 3: Heredograma da família do paciente 2.....	27
Figura 4: Representação da localização aproximada das deleções estudadas e da distribuição dos primers, flanqueando os pontos de quebra.....	30
Figura 5: Determinação da fase exponencial da reação de PCR para o gene beta.....	33
Figura 6: Posição aproximada dos pares de primer utilizados no rastreamento de deleções novas, por dosagem gênica baseada em Multiplex fluorescente.....	35

Figura 7: Análise da deleção responsável pela ($\delta\beta$) ^o -talassemia Siciliana.....	40
Figura 8: Gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio para Persistência hereditária de hemoglobina fetal do tipo 1.....	41
Figura 9: Gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio para Persistência hereditária de hemoglobina fetal do tipo 2.....	41
Figura 10: Gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio para Persistência hereditária de hemoglobina fetal do tipo 3.....	42
Figura 11: Imagem invertida do gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio para Persistência hereditária de hemoglobina fetal do tipo 4.....	42
Figura 12: Gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio para Persistência hereditária de hemoglobina fetal do tipo 5.....	43
Figura 13: Imagem invertida do gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio para Persistência hereditária de hemoglobina fetal do tipo 6.....	43
Figura 14: Imagem invertida do gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio para ($\delta\beta$) Thalassemia Espanhola.....	44
Figura 15: Eletroesferogramas do Multiplex I.....	47
Figura 16: Gráfico comparando os dados do Coeficiente de Dosagem Gênica de uma amostra controle, de uma deleção Siciliana e de um indivíduo estudado.....	48
Figura 17: . Imagem invertida do gel de agarose 0,9 %, corado com brometo de etídio, com fragmento contendo ponto de quebra.....	49
Figura 18: Representação da sequência correspondente ao ponto de quebra da PHHF-2, em comparação com a região montante normal e jusante normal.....	50
Figura 19: Modelo para o efeito de diferentes deleções no cluster da β globina.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

CDG: Coeficiente de Dosagem Gênica

DNA: Deoxyribonucleic acid

dNTP: deoxinucleotídeo trifosfato

Hb F: Hemoglobina Fetal

Hb S: Hemoglobina falcêmica

HS: Hypersensitivity sites

Kb: Kilobase

LCR: Locus Control Region

L: Litros

µl: Microlitros

min: Minutos

ml: Mililitros

mmol: Milimol

ng: Nanogramas

pb: Pares de base

PCR: Polymerase Chain reaction

PHHF: Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal

pmol: Picomol

r.p.m: Rotações por minuto

Seg.: Segundos

U: Unidades

RESUMO

RESUMO

Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF) consiste num grupo heterogêneo de desordens hereditárias, clinicamente benignas, onde ocorrem falhas na mudança perinatal normal de hemoglobina fetal para hemoglobina adulta, resultando em altos níveis de Hb F durante a vida adulta. Suas alterações moleculares correspondem a desordens no grupo de genes β , sendo divididas em duas categorias: as formas deletoriais e as substituições de um nucleotídeo. Um total de seis deleções relacionadas a PHHF já foram descritas na literatura, sendo associadas a aumentos de ambos os tipos de cadeias γ (γ^A e γ^G). $(\delta\beta)^\circ$ - Talassemias também se originam a partir de deficiências gênicas, em muitos casos bastante similares às que originam as formas deletoriais de PHHF, entretanto com menor incremento de Hb F e concomitância de hipocromia e microcitose nas hemácias. Três hipóteses principais foram propostas para explicar a relação destas deleções com a não supressão normal dos genes γ na fase adulta: a remoção de regiões competidoras pelo LCR, a justaposição de elementos acentuadores e a remoção de silenciadores do cluster. Neste trabalho, investigamos a presença de deleções, associadas a PHHF e $(\delta\beta)^\circ$ - talassemias, no cluster da beta-globina em doadores de sangue do Hemocentro e pacientes do Hospital das Clínicas, Unicamp. Para isto, desenvolvemos uma modificação de uma técnica descrita previamente para Distrofia Muscular Duchenne/ Becker, baseada na possibilidade de se identificar diferenças quantitativas na amplificação de amostras por PCR, em presença de deleções ou duplicações, onde o produto final de amplificação é diretamente proporcional à quantidade inicial de cópias da sequência alvo. O método, que quantifica por intensidade de fluorescência, identificou em cinco indivíduos, a deleção responsável por PHHF-2, de origem africana. Identificamos também, com primers específicos que flanqueiam os pontos de quebra de deleções, a presença da $(\delta\beta)^\circ$ - talassemias do tipo Siciliana em dois indivíduos estudados, que são heterozigotos compostos, tendo associação desta alteração com β - talassemia e Hb S. Este trabalho contribuiu para o desenvolvimento e aplicação de um método, particularmente mais rápido e de fácil execução, na investigação de deficiências gênicas (ou aumento do número de cópias), e que pode vir a ser utilizado no estudo de alterações, não só no cluster da

β -globina, mas também em outros genes de interesse. Além disto, os dados apresentados neste trabalho sobre a interação entre $(\delta\beta)^0$ -talassemia Siciliana com β - Talassemia e Hb S representam os primeiros casos descritos no Brasil, com caracterização clínica e molecular. Também destaca-se a presença marcante de uma alteração benigna (PHHF-2) que sabidamente pode influenciar a evolução clínica de determinadas condições, tais como β -talassemia e anemia falciforme.

1 - INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento ontogenético normal ocorrem mudanças ("switching") na expressão dos genes responsáveis pelos diferentes tipos de hemoglobinas humanas. Assim, durante o período embrionário, são encontradas as hemoglobinas Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$) e Portland ($\zeta_2\gamma_2$), no período fetal a Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) e durante a vida adulta as Hb A1 ($\alpha_2\beta_2$) e Hb A2 ($\alpha_2\delta_2$) (Stamatoyannopoulos & Nienhuis, 1994). Estas mudanças estão relacionadas com a organização dos genes, que constituem uma família multigênica separada em dois grupos (*clusters*), no cromossomo 16, para os genes α , e cromossomo 11, para os genes β . O primeiro grupo incluem os genes para as cadeias zeta (ζ), alfa (α) e teta (θ), enquanto o segundo é constituído dos genes para as cadeias épsilon (ε), gama (γ^A e γ^G), delta (δ) e beta (β). Estes genes são ativados durante o desenvolvimento na mesma ordem linear em que estão distribuídos no cromossomo, o que fornece a base para o desenvolvimento de modelos de regulação e expressão destes genes (Bunn & Forget, 1986).

1.1 – Expressão gênica no cluster da beta-globina

A expressão normal dos genes dispostos no cluster da β globina depende da presença de um importante elemento regulador, denominado LCR (*Locus Control Region*), que é caracterizado por sua habilidade em dirigir uma alta expressão de genes ligados, de maneira tecido específica, em todos os sítio de integração examinados em experimentos com transgênicos (Bulger & Groudine, 1999). O LCR consiste de cinco sítios hipersensíveis à DNase I (HSs) dispostos ao longo de 20-30 Kb, na região montante (5') do cluster. O modelo corrente para explicar o funcionamento do LCR propõe um mecanismo de abertura de cromatina, tornando-a ativa para transcrição, e interação do LCR com as regiões promotoras de cada gene, ao longo do desenvolvimento, através de formação de alças (*looping*) (Wijgerde *et al*, 1995). Uma proposta mais recente propõe a ligação em série de complexos protéicos (*linking*) (Bulger & Groudine, 1999). De qualquer forma, LCR, fatores de transcrição, acentuadores, silenciadores e promotores de cada gene, devem participar na regulação da

expressão dos genes que codificam as cadeias de globina do tipo β (Jane, 1998; Blau & Stamatoyannopoulos, 1994) (Figura 1).

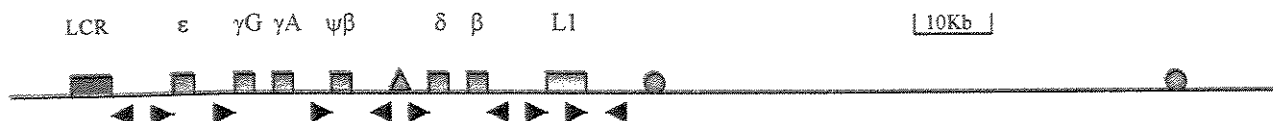


Figura 1. Esquema da disposição dos genes e alguns elementos regulatórios no cluster da β -globina. Algumas destas regiões serão discutidas mais adiante no texto. As setas indicam a posição de repetições Alu.

1.2 – Alterações das hemoglobinas:

As alterações das hemoglobinas podem ser classificadas em quatro grandes grupos: as variantes estruturais, sendo a Hb S, responsável pela anemia falciforme, a mais importante e freqüente, as síndromes talassêmicas, as anomalias do padrão de desenvolvimento ontogenético normal e algumas alterações adquiridas de sua produção (Weatherall & Clegg, 2001; Bradley & Ranney, 1973; Bunn & Forget, 1986; Serjeant & Serjeant, 2001).

1.2.1 - Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal:

Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF) consiste num grupo heterogêneo de alterações hereditárias, sem manifestações clínicas significativas, onde

ocorrem falhas na mudança perinatal normal de hemoglobina fetal para hemoglobina adulta, resultando em altos níveis de Hb F durante a vida adulta (Forget, 1998; Jane, 1998; Bollekens & Forget, 1991). As alterações moleculares ocorrem no grupo de genes β , sendo divididas em duas categorias: as formas delecionais e não delecionais de PHHF.

Os tipos não delecionais caracterizam-se, de forma geral, por aumentos significativos de um dos tipos específicos de cadeias γ , seja γ^A ou γ^G , associados a mutações de ponto nos promotores dos genes responsáveis pela síntese destas cadeias. Propõe-se que estas alterações interfiram na ligação específica de elementos em trans com as seqüências promotoras, seja prevenindo a ligação de elementos supressores ou facilitando a ligação de fatores de regulação positiva (Forget, 1990).

Nos tipos delecionais ocorre normalmente aumento de ambas as cadeias, γ^A e γ^G , até 30%, estando associadas a deleções de seqüências de DNA dentro do grupo de genes β . Um total de seis deleções relacionadas a PHHF já foram descritas na literatura (Forget, 1998). PHHF-1 (Collins *et al.*, 1987; Feingold & Forget, 1989) e PHHF-2 (Collins *et al.*, 1987; Henthorn *et al.*, 1990), caracterizam-se por grandes deleções de aproximadamente 105 Kb (Kilobases) com pontos de quebra deslocados apenas 5-6 Kb. PHHF-3 (Kutlar *et al.*, 1984; Henthorn *et al.*, 1986) e PHHF-4 (Ottolenghi *et al.*, 1982; Saglio *et al.*, 1986) são menos extensas, envolvendo aproximadamente 50Kb e 40Kb respectivamente. PHHF-5 (Camaschella *et al.*, 1990) é relativamente pequena e estende-se do ponto aproximadamente 3Kb a montante (5') do gene δ até 0,7 Kb a jusante (3') do gene β . PHHF-6 (Winichagoon *et al.*, 1990; Kosteas *et al.*, 1997) tem tamanho similar a PHHF dos tipos 1 e 2 (aproximadamente 101 Kb), mas desloca-se na direção 5' e envolve a deleção do gene γ^A .

PHHF – 1 e PHHF – 2 já foram descritas na população brasileira (Gonçalves, 1993; Gonçalves *et al.*, 1995), e, segundo os estudos realizados pelos programas de triagem do Hemocentro e do Hospital das clínicas da Unicamp para alterações das hemoglobinas, a frequência de Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal, ou seja, indivíduos com Hb F elevada, nesta população, é de aproximadamente 0.1%. Além disto, a análise regular das hemoglobinas em doadores de sangue e pacientes do Hemocentro da Unicamp possibilitam a identificação de numerosos casos, com alterações moleculares ainda não definidas.

1.2.2 - Delta-beta Talassemias:

As $(\delta\beta)^\circ$ - talassemias também se originam a partir de deleções, em muitos casos bastante similares às que originam as formas delecionais de PHHF, entretanto com níveis de HB F aumentados em menor proporção (5-20%), sendo acompanhadas nos heterozigotos por hipocromia e microcitose nas hemácias (Weatherall *et al.*, 2001). A forma mais comum ocorre na região do Mediterrâneo (Henthorn *et al.*, 1990), mas outras formas foram descritas em famílias do sudeste asiático (Zhang *et al.*, 1988; Trent *et al.*, 1988), leste europeu (Palena *et al.*, 1992), Afro-Americanas (Anagnou *et al.*, 1985; Waye *et al.*, 1994), Turcas (Craig *et al.*, 1995; Öner *et al.*, 1996), indiana (Gilman *et al.*, 1992), espanholas (Feingold & Forget, 1989) e do Japão (Shiokawa *et al.*, 1988). A Figura 2 mostra a disposição de deleções, ao longo do cluster da beta globina, que originam Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal e $(\delta\beta)^\circ$ Talassemias.

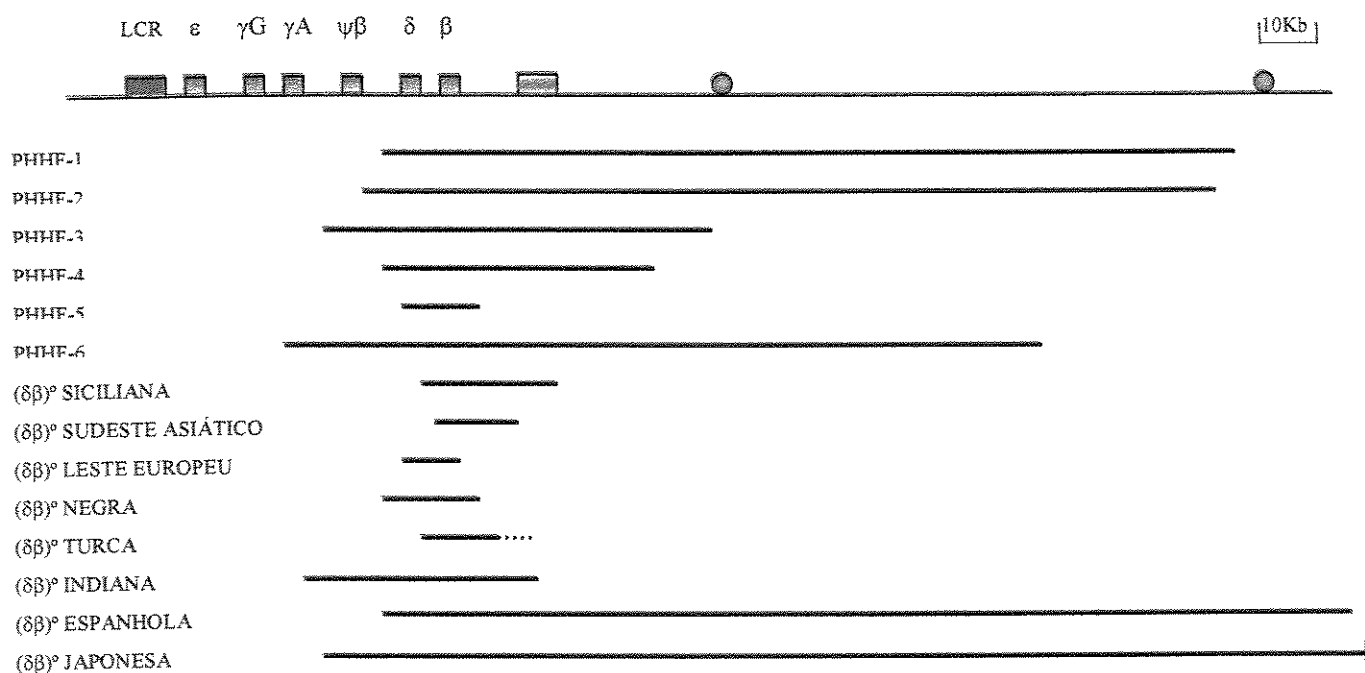


Figura 2. Posição de deleções que originam Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal e $(\delta\beta)^\circ$ Talassemias.

1 . 2 . 3 – Origem das deficiências gênicas:

Um dos mecanismos bem caracterizados, que podem originar deficiências gênicas, é o *crossing over* desigual, onde ocorre um pareamento irregular durante a meiose, com permuta entre as cromátides. Este processo é facilitado no complexo da β globina, por que este conjunto de genes é constituído de uma família gênica, com várias regiões de homologia. A hemoglobina Lepore, por exemplo, é originada por este mecanismo e se apresenta híbrida, com partes dos genes δ e β (Weatheral *et al*, 2001).

Um segundo mecanismo proposto surgiu da observação de que algumas deleções possuem extensão similares. É o caso dos tipos de PHHF-1 e PHHF-2, além de outras deleções que englobam todo o conjunto, como as $(\epsilon\gamma^G\gamma^A\delta\beta)^\circ$ talassemias. Neste caso, uma possível explicação seria a perda de alças inteiras de cromatina durante a replicação do DNA (Collins *et al*, 1987). Os pontos de quebra seriam deslocados, de uma deleção para outra, a depender de onde o DNA se encontra ancorado à matriz nuclear (MAR- Regiões de Ancoramento à Matriz), e de onde ocorrem as quebras nestes pontos de ancoramento.

Apesar de se identificar ao longo do cluster regiões potenciais para recombinação não homóloga, como repetições Alu e L1, ao se observar os pontos de quebra das deleções, estas regiões não são encontradas de forma significativa. Parece, assim, que elas não desempenham um papel marcante na origem de deficiências gênicas. Este fato também foi observado na análise de várias deleções no gene da distrofina humana (MacNaughton *et al*, 1998).

1 . 2 . 4 – Efeito das deficiências gênicas:

Três hipóteses principais foram propostas para explicar a relação destas deleções com a ausência de supressão normal dos genes γ na fase adulta. A primeira sugere a competição entre promotores pelo LCR . Em condições normais, esta competição favoreceria os genes δ e β na fase adulta, como resultado da conformação da cromatina e atuação de fatores de transcrição. Com a remoção destes genes ou de seus promotores, o gene γ estaria livre para interagir com o LCR, elevando, desta forma, os níveis de Hb F (Weatheral *et al*, 2001). Como as formas de β -talassemia, onde há remoção apenas do gene β , são mais graves, postula-se que

deve haver a remoção tanto de δ quanto de β , para que haja um aumento expressivo de Hb F, como ocorre com PHHF e $(\delta\beta)^0$ talassemias.

Outra hipótese considera que a expressão aumentada dos genes γ reflete a justaposição de elementos acentuadores (*enhancers*), normalmente encontrados a 3' do cluster, nas proximidades dos genes γ (Tuan *et al.*, 1983; Anagnou *et al.*, 1995). Diversos estudos, inclusive em camundongos transgênicos, mostram que as seqüências a jusante destas deleções possuem atividade acentuadora, aumentando a expressão gênica (Feingold & Forget, 1989; Anagnou *et al.*, 1995; Arcasoy *et al.*, 1997; Calzolari *et al.*, 1999). Na PHHF do tipo 1, por exemplo, a seqüência a 3' do ponto de quebra possui atividade acentuadora em ensaios de laboratório (Feingold & Forget, 1989), é especificamente hipometilada (Feingold & Forget, 1989) e contém sítio hipersensível à DNase I nos eritrócitos (Elder *et al.*, 1990), além de codificar uma proteína da família de receptores olfativos (Feingold *et al.*, 1999).

Uma terceira hipótese sugere que elementos silenciadores, localizados entre γ^A e δ são removidos pelas deleções (Huisman *et al.*, 1974; Vitale *et al.*, 1994). Neste caso, a região seria removida nas formas delecionais de PHHF, mas mantida na maior parte dos tipos de $(\delta\beta)^0$ talassemias, onde os níveis de Hb F são mais baixos. Entretanto, estudos recentes demonstram que uma região potencialmente silenciadora, que distingue a $(\delta\beta)^0$ talassemia de origem Africana da PHHF-5 na porção 5', e localizada aproximadamente 3Kb a montante de δ , não afeta a expressão do gene γ , mas estimula a expressão de β (Calzolari *et al.*, 1999). Este estímulo pode se dar através da ligação na região de um complexo PYR, responsável pelo rompimento de estruturas repressivas de cromatina (O'Neill *et al.*, 1999).

O estudo estrutural e funcional dessas deleções fornece importantes informações a respeito dos mecanismos que originam as deleções (Henthorn *et al.*, 1990; Roth *et al.*, 1985; Roth & Wilson, 1986), além do mecanismo molecular envolvido na expressão diferencial dos genes da globina durante o desenvolvimento (Bunn & Forget, 1986; Stamatoyannopoulos & Nienhuis, 1994). Também, pelo fato do nível aumentado de Hb F concomitante a certas hemoglobinopatias, como β -talassemias e anemia da célula falciforme, amenizar estas condições, é de fundamental importância a compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação e expressão dos genes da globina γ , para que possam ser desenvolvidos métodos de terapia gênica eficazes para estas desordens (Bunn, 1993; Bunn, 1997; Jane, 1998).

2- OBJETIVOS

2 -OBJETIVOS

2 . 1 - Identificar, através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), o tipo de deleção responsável pelos níveis aumentados de Hb F em pacientes com PHHF e $(\delta\beta)^0$ talassemias detectados no Hemocentro da Unicamp, utilizando iniciadores específicos para as deleções já conhecidas;

2 . 2 - Nos casos não identificados pelo método anterior, estabelecer e padronizar uma técnica quantitativa baseada em PCR multiplex, com primers marcados com fluorescência para o grupo de genes β , para detecção aproximada do ponto de quebra da deleção;

2 . 3 - Sequenciar o ponto de quebra das deleções e as possíveis seqüências envolvidas na expressão continuada dos genes da globina γ .

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 – Casuística:

Foram selecionados sete indivíduos, dentre pacientes do Hospital das Clínicas e doadores de sangue do Hemocentro- Unicamp, que possuíam níveis de hemoglobina fetal acima do normal (Tabela 1).

Tabela 1. Dados hematológicos dos indivíduos estudados. GV-glóbulos vermelhos; VCM- valor corpuscular médio; HCM- hemoglobina corpuscular média; Hb- hemoglobina; Pac.- paciente; $\gamma A=\gamma G$ – mesma proporção entre os dois tipos de cadeia.

Pac./doador	GV(10^6mm^3)	Hb (g/dl)	VCM (fl)	HCM (pg)	HbF (%)	HbA ₂ (%)	Suspeita Clínica
1	4,36	10,3	73,4	25,6	66,4	2,2	$\beta/\delta\beta$ -talassemia
2	4,7	11,0	68,0	23,0	12,1	1,1	HbS/ $\delta\beta$ -talassemia
3	4,85	15,3	97,0	31,6	28,34	1,6	PHHF(cadeias $\gamma A=\gamma G$)
4	4,77	13,8	89,0	28,9	18,84	2,2	PHHF(cadeias $\gamma A=\gamma G$)
5	5,01	14,6	88,0	29,2	17,5	2,26	PHHF(cadeias $\gamma A=\gamma G$)
6	5,03	13,8	80,9	27,4	20,1	1,7	PHHF(cadeias $\gamma A=\gamma G$)
7	5,17	13,8	81,0	26,7	18,0	1,84	PHHF(cadeias $\gamma A=\gamma G$)

O paciente 1, do sexo masculino e descendência Italiana, apresentou um quadro típico de Talassemia Intermedia, com hipocromia e microcitose moderadas. Este paciente faleceu aos 42 anos, provavelmente como consequência de um choque anafilático. Ele possui uma irmã com quadros clínicos e laboratoriais similares (Tabela 2). A eletroforese de hemoglobina demonstrou Hb A₂ e Hb F.

O paciente 2, 40 anos de idade, do sexo masculino e descendência Italiana e Africana, apresentou um quadro leve de anemia falciforme, com hipocromia e microcitose moderadas.

Ele sofreu esplenectomia aos 28 anos, e possui uma história de crises vaso-oclusivas frequentes, requerendo hospitalização. Duas irmãs apresentaram quadros clínicos e laboratoriais similares (Table 2). Eletroforese de hemoglobina demonstrou presença de Hb A₂, Hb F e Hb S. A Figura 3 mostra o heredograma da família 2.

Tabela 2. Dados hematológicos das famílias dos pacientes 1 e 2. GV-glóbulos vermelhos; VCM- valor corpuscular médio; HCM- hemoglobina corpuscular média; Hb- hemoglobina

	GV ($\times 10^6$ cels/ μ L)	Hb (g/dL)	VCM (fL)	HCM (pg)	HbA₂ (%)	HbF (%)	HbS (%)
Família 1							
Paciente 1	4.3	10.6	73	23	2.2	66.4	-
Irmã	3.8	8.7	72	22	1.6	98.4	-
Família 2							
Paciente 2	4.3	10.5	72	24	1.1	12.1	86.9
Irmã 1	4.3	10.5	71	24	1.3	20.7	78.0
Irmã 2	3.8	10.8	80	27	1.5	17.4	81.1
Filho	5.5	11.1	61	20	1.5	23.0	-
Filha	5.4	12.2	72	22	1.4	21.0	-

Os demais indivíduos estudados eram doadores de sangue sem alterações clínicas. Eles foram selecionados por possuírem níveis de Hb F elevado, além de terem quantidade de cadeias γ A e γ G aproximadas, o que indica presença de PHHF por deficiência gênica.

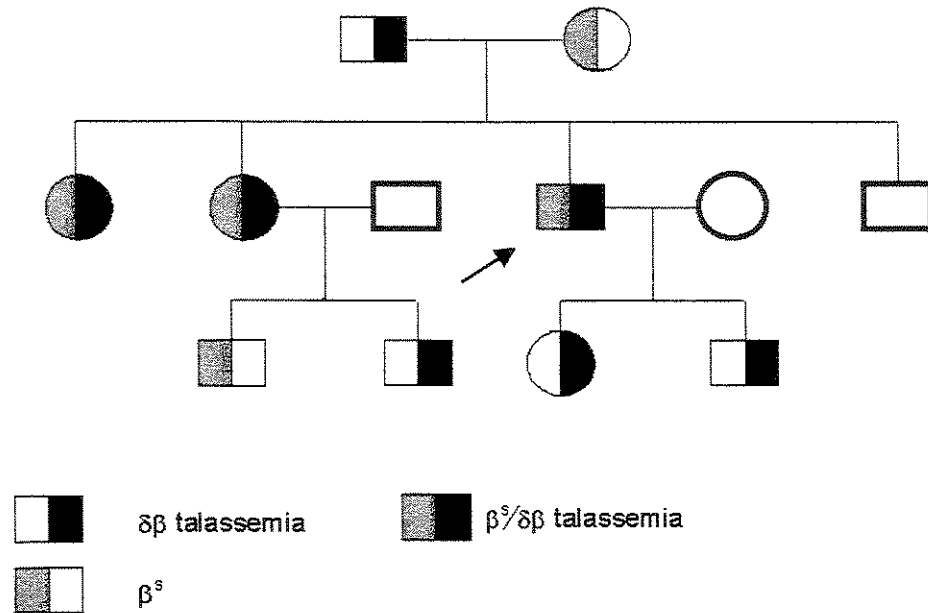


Figura 3. Heredograma da família do paciente 2.

3.2 – Métodos:

3.2.1 – Dados hematológicos: Os dados hematológicos foram determinados eletronicamente. A eletroforese de hemoglobina foi realizada em acetato de celulose com tampão Tris-EDTA-ácido bórico em pH 8.9. Hb A₂ foi quantificada espectrofotometricamente (Dacie & Lewis, 1984). Os níveis de Hb F foram determinados por desnaturação alcalina e a análise realizada em gel de urea-triton-acrilamida (Betke e cols., 1959). A proporção G γ /A γ foi estimada por análise densitométrica (Alter e cols., 1980).

3 . 2 . 2 - Extração do DNA:

3 . 2 . 2 . 1- Fenol: Aproximadamente 1ml de sangue foi centrifugado em tubo eppendorf (1.5ml) a 13.000 r.p.m por 7min., para precipitação dos leucócitos. Após retirada do plasma, foi adicionado 1ml de solução de lise de hemácias [NH_4Cl - 0.144 M; NH_4HCO_3 - 0.01M], com posterior centrifugação a 13.000 r.p.m por 7min. Ao precipitado foi adicionada solução de lise de leucócitos [4 ml de tampão de lise de leucócitos (NaCl 0.3 M, EDTA 0.01 M, Tris-HCl pH 7.5 0.01M); 1.68 g de Uréia; 400 μl de SDS –20%]. Ao sobrenadante foi adicionada uma mistura de fenol:clorofórmio, para extração (2X) do DNA. O DNA foi precipitado em etanol absoluto e ressuspendido em água deionizada estéril.

3 . 2 . 2 . 2- Kit Amershan- Pharmacia para extração de DNA genômico (GFX Genomic Blood DNA Purification Kit): Os procedimentos para extração são os mesmos descritos pelo fabricante, e consiste na extração e purificação de DNA através de colunas de sílica. O DNA foi ressuspendido em 400 μl de água estéril.

3 . 2 . 3 – Detecção de deleções conhecidas por PCR:

Com o intuito de identificarmos deleções conhecidas, relacionadas com Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal, selecionamos uma série de iniciadores ("primers") para PHHF-1, PHHF-2, PHHF-3 (Craig e cols., 1994), PHHF-4 (Saglio e cols., 1986), PHHF-5 (Camaschella e cols., 1990) e PHHF-6 (Kosteas e cols., 1997), além de duas deleções responsáveis pelas $(\delta\beta)^0$ - Talassemias Siciliana e Espanhola (Craig e cols., 1994).

Tabela 3. Relação de iniciadores utilizados para amplificar as deleções de PHHF e ($\delta\beta$)^o- Talassemia Siciliana e Espanhola. (Craig et al., 1994)

Deleção	Iniciadores	Sequência (5' → 3')
PHHF- 1	A1	AGAATGTCACACTTAGAATCTG
	A2	CACTTTAATTCTGGTCTACCTGAA
	A3	ACTGTGATGTTGGAAATGGAC
PHHF- 2	B1	GACATGGACTATTGTTCAATGA
	B2	TGCTATGCCAACTCACTACC
	B3	TTTATATATGAAATGCTACTGATT
PHHF- 3	B1	GACATGGACTATTGTTCAATGA
	C1	CTTTGCTGTTCAAGGCTTAATTT
	C2	GACACAGAGCAGTGATTGGTGCA
PHHF-4	PHF5-E	ACAGTGTGCAGTGATTATT
	A2	CACTTTAATTCTGGTCTACCTGAA
	C2	GACACAGAGCAGTGATTGGTGCA
PHHF-5	PHF5E	ACAGTGTGCAGTGATTATT
	PHF5D	CTGAGGAAGAATGGGACTTCCATT
	A2	CACTTTAATTCTGGTCTACCTGAA
PHHF-6	PHF6E	CTCTATAGGACAGGACTCCTCAGA
	PHF6D	CTGCAGTAGAGCCTTAGGTATTAACG
($\delta\beta$) ^o -Siciliana	F1	TTGGGTTTCTGATAGGCACTG
	F2	GTGTCACCCATTAATGCCTTGAC
	F3	TAGATCCCTTTGCCAT TATG
($\delta\beta$) ^o -Espanhola	A1	AGAATGTCACACTTAGAATCTG
	A2	CACTTTAATTCTGGTCTACCTGAA
	D1	AGCCCGCCACTGCACTGTG

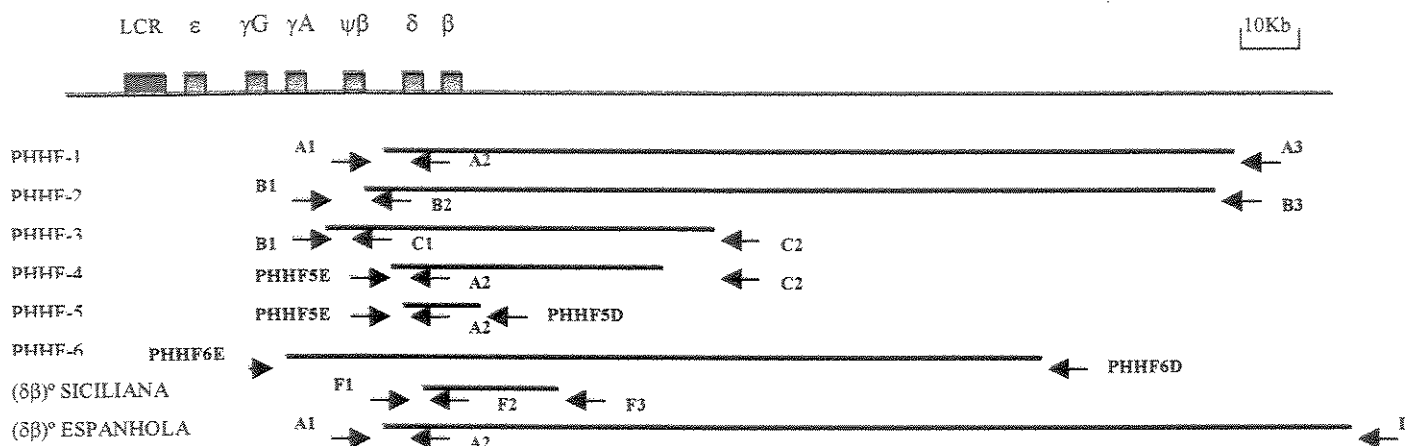


Figura. 4. Representação da localização aproximada das deleções estudadas e da distribuição dos primers, flanqueando os pontos de quebra (modificado de Craig et al., 1994).

Para cada reação são utilizados três oligonucleotídeos iniciadores, desenhados para amplificar um produto específico na presença da deleção e um outro, de diferente tamanho, representando o alelo normal, ou controle. Cada deleção possui uma combinação específica de iniciadores (Craig e cols., 1994). Os primers estão listados na Tabela 3. A Figura 4 mostra um esquema da disposição dos primers em relação às deleções estudadas. Utilizamos também para as deleções do tipo PHHF-4 e PHHF-5, o primer A2 (Craig e cols., 1994), para amplificação do alelo normal. Assim, para estas deleções, temos um alelo normal de aproximadamente 1.7 Kb e um mutante esperado de 2kb e 930pb, respectivamente. Os primers para o tipo PHHF-6 amplificam um fragmento de 1.5kb, em presença da deleção. Uma reação padrão consiste num volume final de 25µl, com 100ng de DNA molde; 0.2 mmol/L de cada dNTP; 0.5 U de Taq DNA polimerase e 10 pmoles de cada oligonucleotídeo, diluídos em tampão de PCR. As condições das reações, realizadas no termociclador Perkin Elmer Cetus estão listadas na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros utilizados nas reações de PCR para detecção de deficiências gênicas conhecidas

Deleção	Desnaturação inicial	Desnaturação	Hibridização	Extensão	Extensão final
	1 ciclo		30 ciclos		1 ciclo
PHHF – 1	94° C – 5 min.	94° C – 1 min.	54° C – 1.0 min.	72° C – 1.5 min.	72° C – 7 min.
PHHF – 2	94° C – 5 min.	94° C – 1 min.	55° C – 1.0 min.	72° C – 1.5 min.	72° C – 7 min.
PHHF – 3	94° C – 5 min.	94° C – 1 min.	58° C – 1.5 min.	72° C – 2.0 min.	72° C – 7 min.
PHHF – 4	94° C – 5 min.	94° C – 1 min.	54° C – 1.0 min.	72° C – 1.5 min.	72° C – 7 min.
PHHF – 5	94° C – 5 min.	94° C – 1 min.	54° C – 1.0 min.	72° C – 1.5 min.	72° C – 7 min.
PHHF – 6	94° C – 5 min.	94° C – 1 min.	55° C – 1.0 min.	72° C – 1.5 min.	72° C – 7 min.
$\delta\beta$ - Siciliana	94° C – 5 min.	94° C – 1 min.	60° C – 1.0 min.	72° C – 2.0 min.	72° C – 7 min.
$\delta\beta$ - Espanhola	94° C – 5 min.	94° C – 1 min.	58° C – 1.0 min.	72° C – 2.0 min.	72° C – 7 min.

3 . 2 . 4 - Identificação das deleções em gel de agarose:

Após a amplificação, alíquotas de 5 μ l foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1.2%, corado com brometo de etídio (5 μ g/ μ l) e visualizado sob luz ultravioleta, para detecção dos fragmentos de amplificação.

3 . 2 . 5 - Detecção de novas deleções:

Para identificarmos novas deleções, desenvolvemos uma modificação da técnica descrita previamente para Distrofia Muscular Duchenne/ Becker (Yau *et al*, 1996), baseada na possibilidade de se identificar diferenças quantitativas na amplificação de amostras por PCR fluorescente, em presença de deleções ou duplicações, onde o produto final de amplificação é diretamente proporcional à quantidade inicial de cópias da sequência alvo. Na Tabela 5 estão listados os primers desenhados para o mapeamento de deleções.

Tabela 5. Primers marcados com 6-FAM (*) para rastreamento de deleções no cluster da β -globina.

Primers	Região	Seqüência (5' → 3')
BACTE *	β -Actina	ACT CTT CCA GCC TTC CTT C
BACTD	β -Actina	CAG GTC TTT GCG GAT GTC
EPSE *	Gene ϵ	AGA CAG AGA GGC AGC AGC AC
EPSD	Gene ϵ	CTT CCA CAT TCA TCT TGC TCC
BETAE*	Gene β	GTG GAT GAA GTT GGT GGT GAG
BETAD	Gene β	GCC CAG TTT CTA TTG GTC TCC
3'GAMAE *	3' Gene γ A	GCC TGT TTG TGT TTG TGG TG
3'GAMAD	3' Gene γ A	TAC TCC CAC TTG CAG AAC TCC
PSEUE *	$\psi\beta$	ACA AGA AGG CTG CTG CCA C
PSEUD	$\psi\beta$	CTG CCT TTC TGC ACC TTG TC
5'DELE *	5' Gene δ	CCC TCT TCC TTC CTT CCT TTC
5'DELD	5' Gene δ	AAT GGC AGA CAA ATA CAC ACC C
3' BETAE*	3Kb 3' BETA	TAA CGC AGC TCC TCA CCA G
3' BETAD	3Kb 3' BETA	AGC CTT CCT CTC TCA ACT CG
5' EPSE *	16kb5' Gene ϵ	TCC TGC TGG AAT CTC CTC AC
5' EPSD	16kb5' Gene ϵ	AGG CCA CTA ACG AAG AAG ATG
HPF6E*	3' PHHF-6	TCT TTC TCC TGA GGC GTC TG
HPF6D	3' PHHF-6	GGC TGA TCA TGG GCA CAT AG
HPF1E*	3' PHHF-1	AGA CTG AAA GGA AGA GAG GTG G
HPF1D	3' PHHF-1	CTT GGC TAC TCA TCC ATC ATT C

3 . 2 . 5 . 1 – Determinação da fase exponencial da reação: Foi realizada uma escala de ciclos (15-30 ciclos) de amplificação, para determinação da fase exponencial da reação de PCR (Figura 5), que foi obtida pelos valores das áreas dos picos fluorescentes em cada ciclo. Desta forma, podemos determinar a quantidade de ciclos (23 ciclos) que são necessárias para identificarmos diferenças quantitativas nas amostras estudadas.

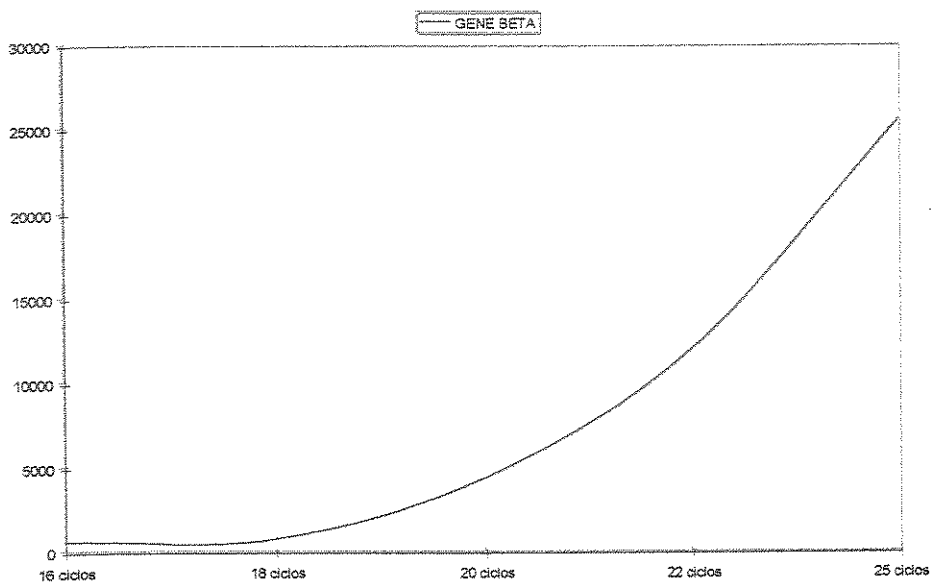


Figura 5 . Determinação da fase exponencial da reação de PCR para o gene beta.

3 . 2 . 5 . 2 – PCR multiplex: Para a primeira série de iniciadores (multiplex I), foram utilizados BACTE e BACTD (como controle interno da β -Actina), BETAE e BETAD (para o gene β), EPSE e EPSD (para o gene ϵ), 5' DELE e 5' DELD (para região 5' do gene δ), PSEUE e PSEUD (para $\psi\beta$), 3' GAMAE e 3' GAMAD (região 3' do gene γA). Uma segunda série de primers (multiplex II) possui BACTE e BACTD , 5' EPSE e 5' EPSD (para uma região 16 Kb 5' do gene ϵ), HPF6E e HPF6D (para a região 3' do ponto de quebra da PHHF-6) e HPF1E e HPF1D (para a região 3' do ponto de quebra da PHHF-1). A terceira série de iniciadores (multiplex III) contem 3' BETAE e 3' BETAD (para uma região 3 KB 3' do gene β), e BACTE e BACTD (como controle interno da β -Actina). Os parâmetros para as reações foram: Desnaturação inicial a 94° C 5min. , seguidos de 23 ciclos de desnaturação a 94° C 1min; anelamento a 60° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 15 segundos; com extensão final a 72° C por 30 min. Cada reação teve um volume final de 25 μ l, com 100ng de DNA molde; 0.2 mmol/L de cada dNTP; 0.5 U de Taq DNA polimerase e 5 pmoles de cada oligonucleotídio, diluídos em tampão de PCR, realizadas no termociclador Perkin Elmer Cetus. As Tabelas 6,7 e 8 mostram o arranjo dos multiplex, e a Figura 6, a posição aproximada das regiões estudadas.

Tabela 6 – Iniciadores que formam Multiplex I.

Primers (Multiplex I)	Tamanho do Fragmento
BETAE e BETAD	83 pb
5' DELE e 5' DELD	93 pb
BACTE e BACTD	100 pb
PSEUE e PSEUD	110 pb
3' GAMAE e 3' GAMAD	120pb
EPSE e EPSD	140 pb

Tabela 7 – Iniciadores que formam Multiplex II.

Primers (Multiplex II)	Tamanho do Fragmento
BACTE e BACTD	100 pb
HPF1E e HPF1D	199 pb
5' EPSE e 5' EPSD	278 pb
HPF6E e HPF6D	140 pb

Tabela 8 – Iniciadores que formam Multiplex III.

Primers (Multiplex III)	Tamanho do Fragmento
3' BETAE e 3' BETAD	73 pb
BACTE e BACTD	100 pb

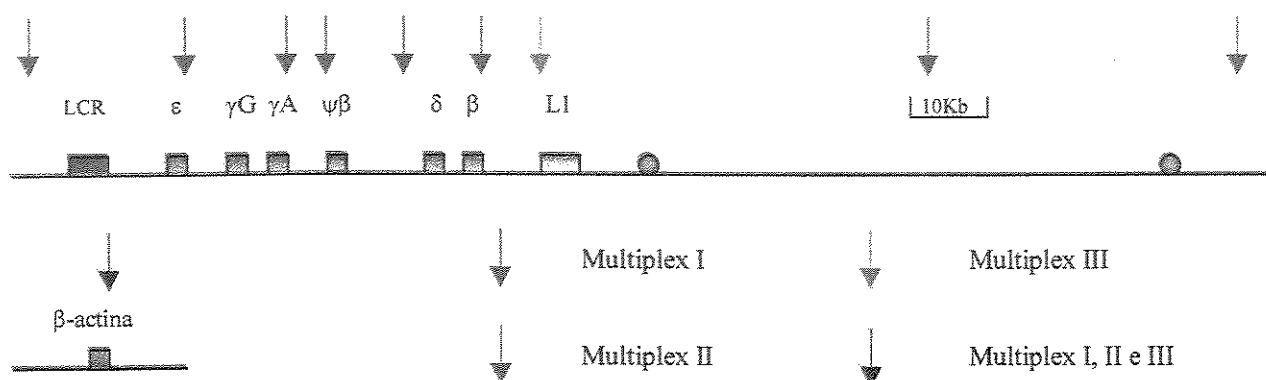


Figura 6. Posição aproximada dos pares de primer utilizados no rastreamento de deleções novas, por dosagem gênica baseada em Multiplex fluorescente.

3 . 2 . 5 . 3 – Análise: Os dados foram analisados em sequenciador automático de capilaridade (310 Genetic Analyser- ABI Prism- Applied Biosystems), com 2µl de cada reação e 1µl de marcador GS Rox 500, diluídos em 20µl de formamida, e em software apropriado (GeneScan-Applied Biosystems). Os dados da área de cada pico foram transferidos para uma planilha de Excel, onde foi calculado o Coeficiente de Dosagem Gênica [CDG = (área do pico x da amostra / área do pico y da amostra) / (área do pico x do controle/ área do pico y do controle)], tendo valores teóricos de 1 para região diplóide normal, 0,5 ou 2 para deleções e 1,5 ou 0,75 (a depender da posição dos valores na fração) para duplicações. Para o cálculo, foi utilizada a média de 3 amostras controles. Além disto, cada reação foi realizada em triplicata.

3 . 2 . 5 . 4 – Amplificação do ponto de quebra:

Para amplificarmos o ponto de quebra das deleções, realizamos uma reação contendo enzima para fragmentos longos (ELONGASE – Life Technologies), e primers que pudessem flanquear a deleção em estudo (Tabela 9). Os parâmetros para a reação foram: Desnaturação inicial a 94° C 1min. , seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94° C 30 segundos; anelamento a 60° C por 1 minuto e extensão a 68° C por 15 minutos. Cada reação teve um volume final de 25µl, com 200ng de DNA molde; 0.2 mmol/L de cada dNTP; 1 µl de ELONGASE (Life Technologies) e 5 pmoles de cada oligonucleotídeo, diluídos em tampões A e B (1:1 – 1.5 mM de MgCl₂), realizadas no termociclador Perkin Elmer Cetus.

Tabela 9 – Iniciadores utilizados nas reações com Elongase.

Primer	Posição	Seqüência (5' → 3')
E1	5' – Entre ψβ e δ	CCGGGACAAGGTGCAGAAAG
HPF1D	3' - PHHF-1	CTTGGCTACTCATCCATCATTC

3 . 2 . 6 - Sequenciamento e análise do ponto de quebra das deleções:

3 . 2 . 6 . 1 – PCR: Foi realizada uma reação de PCR, para obtenção apenas do fragmento mutante, que contém o ponto de quebra da deleção.

3 . 2 . 6 . 2 – Tratamento: 5 µl do fragmento foram tratados com 1µl de fosfatase alcalina e 1µl de exonuclease durante 15 min. a 37° C mais 15 min. a 80° C. Também foi utilizado o kit “Concert Rapid PCR Purification”, da Life Technologies, segundo recomendações do fabricante.

3 . 2 . 6 . 3 – Sequenciamento: Para sequenciamento automático, a 1µl (50-100 ng) do DNA tratado foi adicionado 1µl do primer (1.6 pmol), 1µl de Tampão Big-dye e 7µl de água estéril, e submetido a reação de sequenciamento: 25 ciclos de 94° C 10 seg, 50-54° C 5 seg. , 60° C 4 min.

3 . 2 . 6 . 4 – Purificação: A reação de sequenciamento foi purificada com isopropanol 75% e etanol 70%.

3 . 2 . 6 . 5 – Leitura: As amostras foram sequenciadas em equipamento automático 377 (Perkin Elmer-ABI Prism).

3 . 2 . 6 . 6 – Análise: Para confirmação do ponto de quebra, foi realizado alinhamento da sequência do fragmento com a sequência do cluster da β-globina (GI-455025/ GENE BANK), e de outras sequências de pontos de quebra já caracterizados, utilizando os programas “*BLAST 2 sequence*” e “*Blastn*”, disponíveis em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80>, do “National Center for Biothechnology Information” .

4- RESULTADOS

4 - RESULTADOS

4.1 - Detecção de deleções conhecidas:

O rastreamento inicial com os primers descritos apresentou, em dois indivíduos (pacientes 1 e 2) um alelo mutante para $(\delta\beta)^0$ -Talassemia Siciliana, identificado em gel de agarose 1.2% (Figura 7b). Para os outros tipos não foi identificado alelos mutantes no gel (Figuras 8-14). Para confirmação do ponto de quebra da deleção encontrada, foi realizado sequenciamento direto do fragmento mutante em sequenciador automático 377 (Perkin Elmer- ABI Prism). As seqüências obtidas foram comparadas com as do cluster da beta globina (GI 455025/ GENE BANK) e da região 3' do ponto de quebra da deleção Siciliana (GI-183837/ GENE BANK). A análise revelou as mesmas características descritas por Henthorn e cols, 1990, e Esposito e cols, 1994. Como mostrado na Figura 7c, estas características são: 1- a presença de dois nucleotídios “órfãos” (AC) no sítio específico de quebra e 2- a presença de duas substituições, G→A e T→ G, 15 e 35 nucleotídeos a jusante (3') do ponto de quebra, respectivamente. A deleção começa no segundo intron do gene δ (posição 55942-GENE BANK) e se estende por 13 379 pb, até a região 3' do gene β (posição 69321-GENE BANK), dentro de uma repetição L1 (Figura 7a).

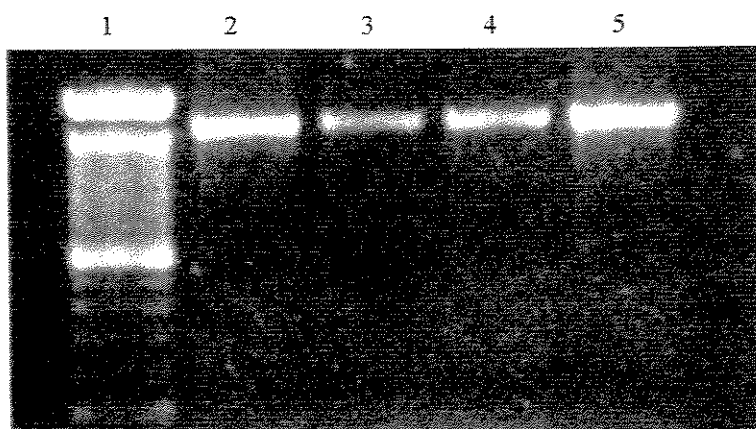


Figura 8. Gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio para Persistência hereditária de hemoglobina fetal do tipo 1. Todos os pacientes mostraram apenas o alelo normal, amplificado com os primers A1 e A2. Linha 1- Marcador 100pb; Linha 2- controle; Linhas 3-5- pacientes.

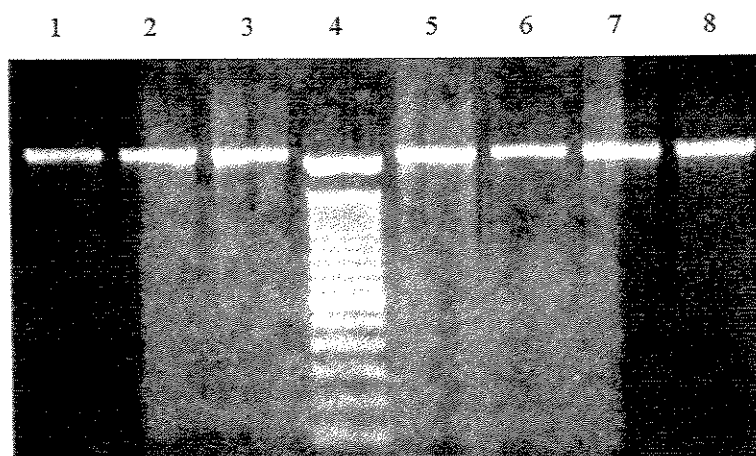


Figura 9. Gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio para Persistência hereditária de hemoglobina fetal do tipo 2. Todos os pacientes mostraram apenas o alelo normal, amplificado com os primers B1 e B2. Linha 1- Controle; Linha 4- Marcador 100pb; Linhas 2,3,5-8 – pacientes.

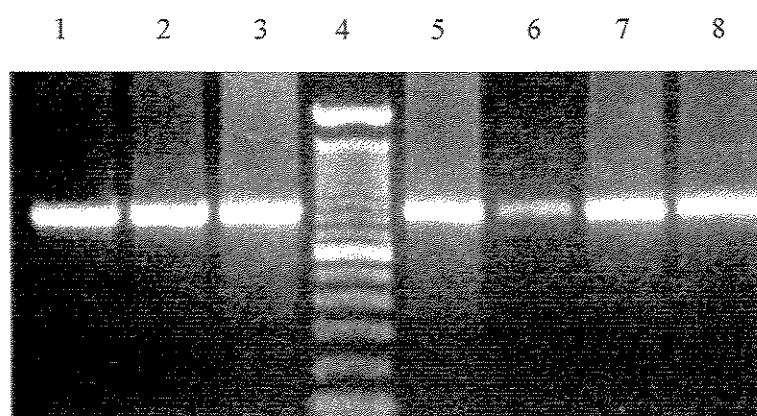


Figura 10. Gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio para Persistência hereditária de hemoglobina fetal do tipo 3. Todos os pacientes mostraram apenas o alelo normal, amplificado com os primers B1 e C1. Linha 1- Controle; Linha 4- Marcador 100pb; Linhas 2,3,5-8 – pacientes.

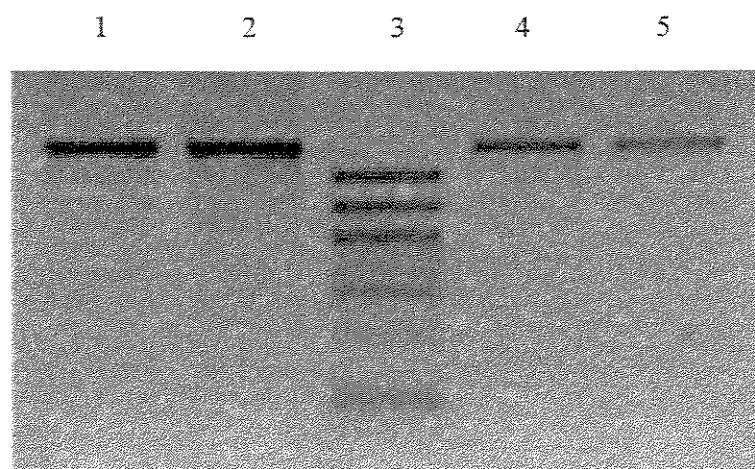


Figura 11. Imagem Invertida do gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio para Persistência hereditária de hemoglobina fetal do tipo 4. Todos os pacientes mostraram apenas o alelo normal, amplificado com os primers PHF5E e A2. Linha 1- controle; Linha 3; Marcador 100pb; Linhas 2,4 e-5- pacientes

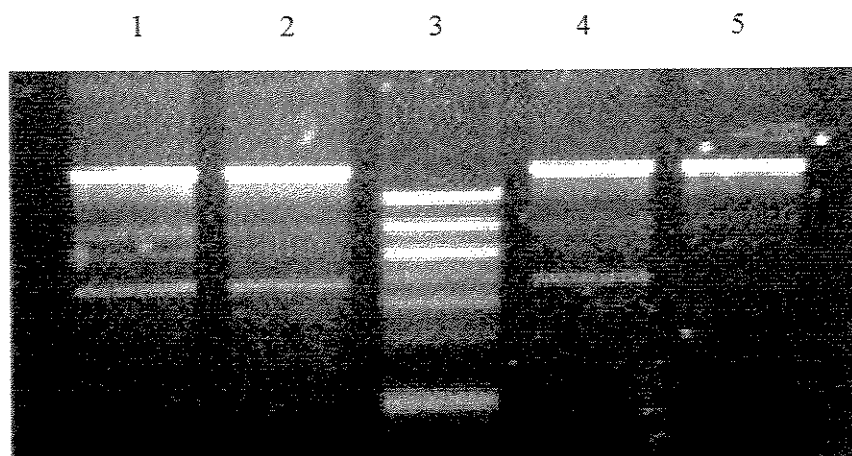


Figura 12 . Gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio para Persistência hereditária de hemoglobina fetal do tipo 5. Todos os pacientes mostraram apenas o alelo normal, amplificado com os primers phf5e e A2. Linha 1- controle; Linha 3; Marcador 100pb; Linhas 2,4 e-5- pacientes

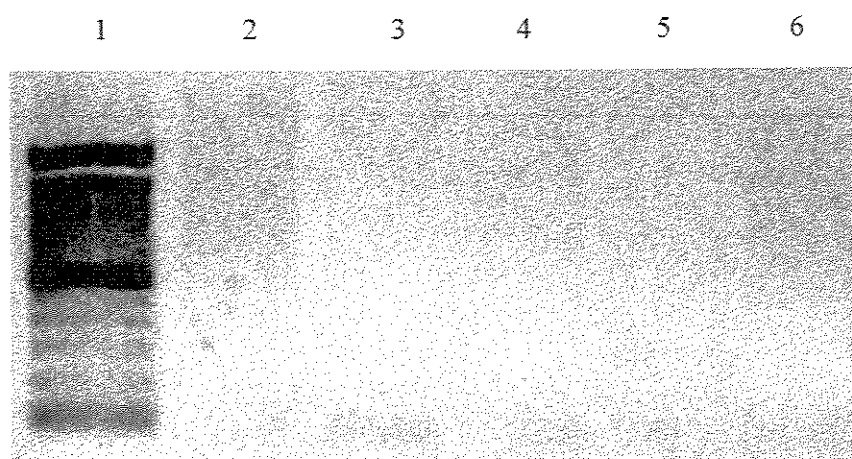


Figura 13. Imagem invertida do gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio para Persistência hereditária de hemoglobina fetal do tipo 6. Nenhum dos pacientes apresentou amplificação do fragmento mutante. Linha 1- Marcador ϕ x 174; Linha 2 - Controle; Linhas 3-6 – pacientes.

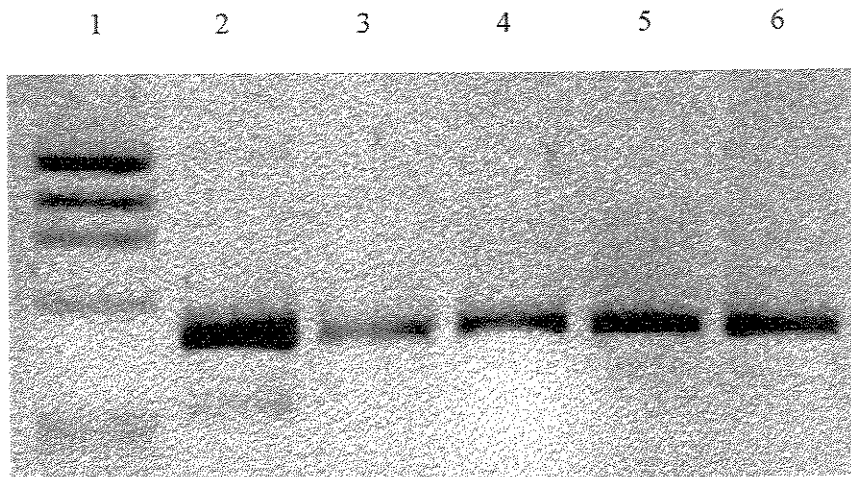


Figura 14. Imagem invertida do gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio para ($\delta\beta$) Thalassemia Espanhola. Nenhum dos pacientes apresentou amplificação do fragmento mutante. No gel, apenas o fragmento normal, amplificado com os primers A1 e A2. Linha 1- Marcador ϕ x 174; Linha 2 - Controle; Linhas 3-6 – pacientes.

4.2 – Detecção de novas deleções:

O rastreamento do cluster da β -globina com os primers fluorescentes identificou, nos indivíduos 3, 4, 5, 6 e 7, valores de coeficiente de dosagem gênica (CDG) próximos aos valores para deleções (0,5). Os valores para uma das amostras são mostrados nos quadros abaixo listados, além de uma amostra com a deleção Siciliana, já caracterizada, e utilizada como controle neste rastreamento. Exemplos de eletroesferogramas produzidos no GeneScan são mostrados na Figura 15.

Quadros de valores de Coeficiente de Dosagem Gênica - *As áreas em negrito representam as regiões detectadas com valores de deleções (0,5 ou 2 – a depender da posição no fração), segundo o cálculo exemplo para deleção Siciliana: $CDG = (\text{área do pico beta da amostra} / \text{área do pico actina da amostra}) / (\text{área do pico beta do controle} / \text{área do pico actina do controle}) = (9247/6867) / (25228,3/ 7774,3) = 0,41$*

Paciente 2 (Deleção Siciliana):

Multiplex I

Região	Área do pico		Região					
	Controle	Amostra	EPSILON	GAMA-A	PSEUDO	5' DELTA	BETA	ACTINA
EPSILON	24849	18949	-	0,97	0,86	0,85	2,08	0,86
GAMA-A	21759,3	17023	1,03	-	0,89	0,87	2,13	0,89
PSEUDO	26315,6	23217	1,16	1,13	-	0,98	2,41	1,00
5' DELTA	28628,6	25780	1,18	1,15	1,02	-	2,46	1,02
BETA	25228,3	9247	0,48	0,47	0,42	0,41	-	0,41
ACTINA	7774,3	6867	1,16	1,13	1,00	0,98	2,41	-

Multiplex II

Região	Área do pico		Região			
	Controle	Amostra	5' EPS.	3' PHHF-6	3' PHHF-1	ACTINA
5' EPS.	3449	821	-	1,17	1,15	1,21
3' PHHF-6	17318,5	3534	0,86	-	0,99	1,04
3' PHHF-1	17764	3669	0,87	1,01	-	1,05
ACTINA	3592	706	0,83	0,96	0,95	-

Multiplex III

Região	Área do pico		Região	
	Controle	Amostra	3' BETA	ACTINA
3' BETA	53141,3	4775	-	0,56
ACTINA	64075	10227	1,78	-

Amostra:

Multiplex I

Região	Área do pico		Região					
	Controle	Amostra	EPSILON	GAMA-A	PSEUDO	5' DELTA	BETA	ACTINA
EPSILON	13550	4662	-	0,76	0,88	1,37	1,85	0,76
GAMA-A	46442	21163	1,32	-	1,16	1,81	2,45	1,00
PSEUDO	28966	11331	1,14	0,86	-	1,55	2,10	0,86
5' DELTA	42950	10818	0,73	0,55	0,64	-	1,35	0,55
BETA	24517	4560	0,54	0,41	0,48	0,74	-	0,41
ACTINA	9757	4441	1,32	1,00	1,16	1,81	2,45	-

Multiplex II

Região	Área do pico		Região			
	Controle	Amostra	5' EPS.	3' PHHF-6	3' PHHF-1	ACTINA
5' EPS.	3449	1343	-	2,71	1,28	1,18
3' PHHF-6	17318,5	2487	0,37	-	0,47	0,44
3' PHHF-1	17764	5384	0,78	2,11	-	0,92
ACTINA	3592	1182	0,85	2,29	1,09	-

Multiplex III

Região	Área do pico		Região	
	Controle	Amostra	3' BETA	ACTINA
3' BETA	53141,3	12351	-	0,76
ACTINA	64075	19710	1,32	-

Os valores de deleções situaram-se nas regiões 5' delta, beta, 3' beta e 3' PHHF-6 (Figura 16). As regiões de pseudo-beta e 3' PHHF-1 apresentaram valores normais, indicando ausência de deleção. Assim, com estes valores, os pontos de quebra estão localizados na região entre pseudo beta e 5' delta (montante) e 3' PHHF-6 e 3' PHHF-1 (jusante). Realizamos reações contendo enzima para fragmentos longos (ELONGASE- Life technologies), com o objetivo de amplificar um fragmento contendo o ponto de quebra. A Figura 17 mostra os fragmentos amplificados (aproximadamente 10 Kb), que foram submetidos a sequenciamento direto.

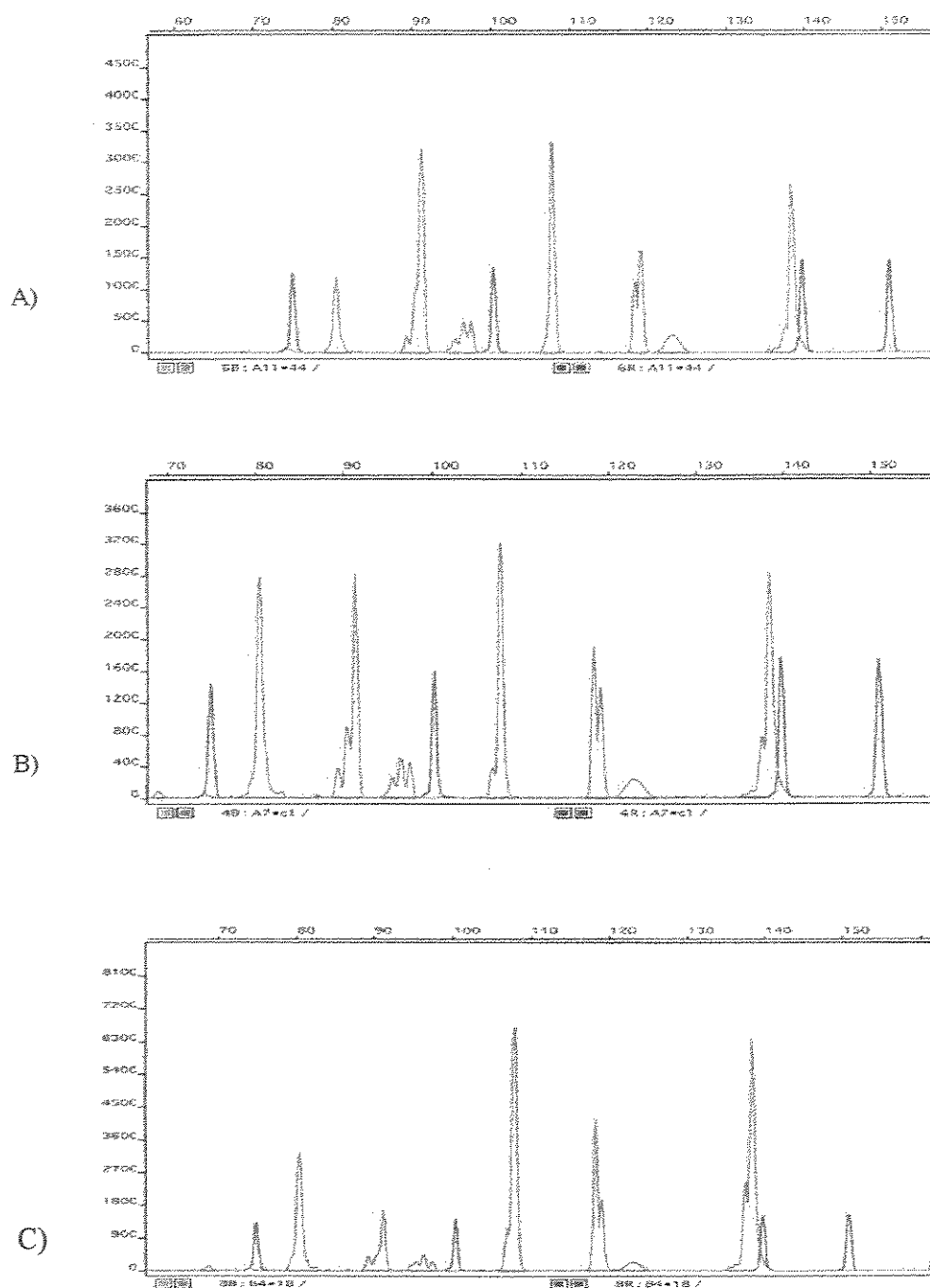


Figura 15. Eletroesferogramas do Multiplex I. Os picos vermelhos representam o marcador de peso molecular GS Rox 500. Os picos de cor azul representam os fragmentos amplificados da reação de multiplex I, que estão na ordem, da esquerda para a direita: beta; 5' delta; beta-actina; pseudo-beta; 3' gama a e epsilon. A- Deleção Siciliana; B – Controle; C – Amostra 3. É possível identificar de forma visível a diferença na amplitude daqueles picos de apenas uma cópia (deleção), em comparação com o controle.

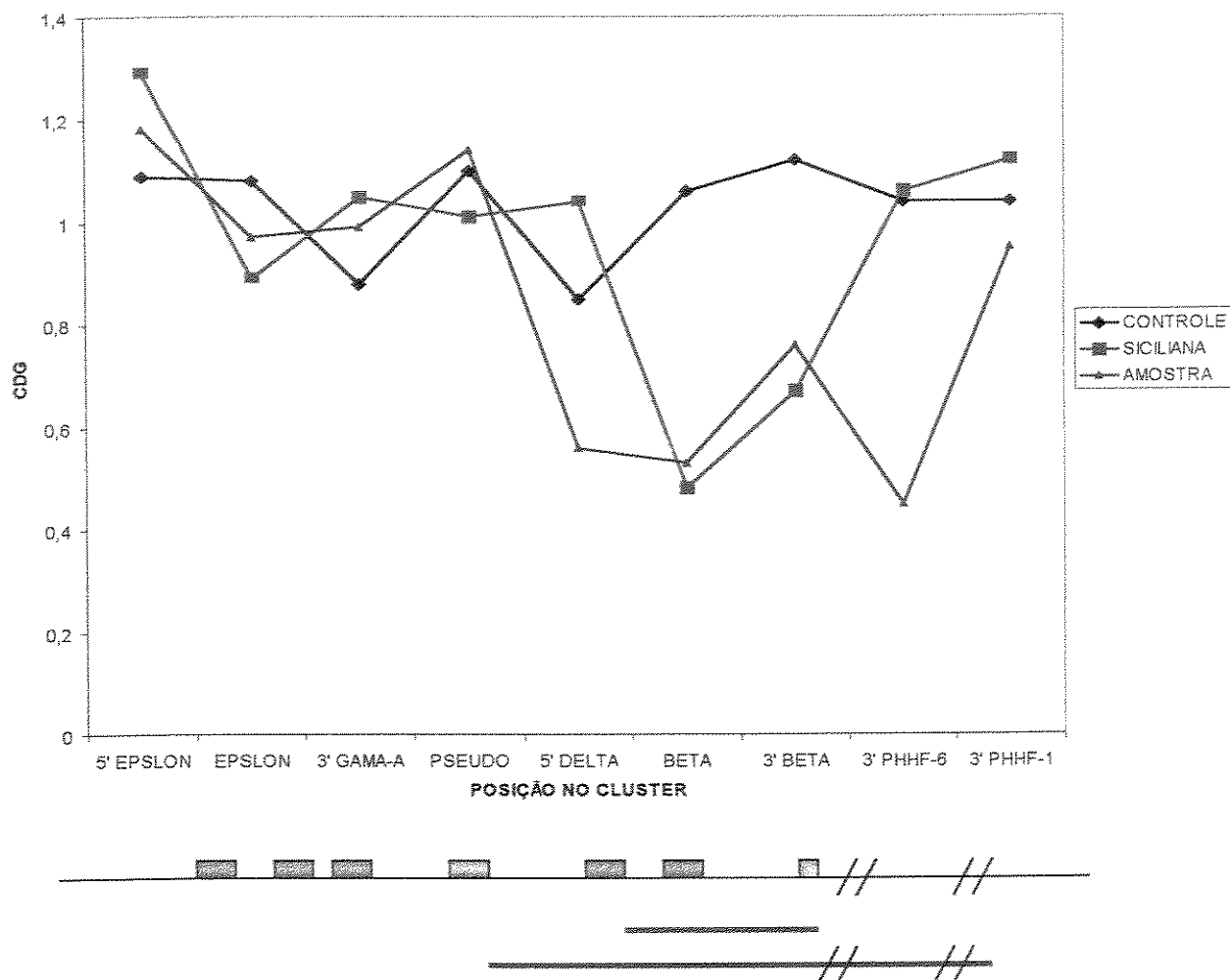


Figura 16. Gráfico comparando os dados do Coeficiente de Dosagem Gênica (referência – beta actina) de uma amostra controle, de uma deleção Siciliana e de um indivíduo estudado. Como esperado para a deleção Siciliana, as regiões beta e 3' beta apresentam valores baixos. A amostra analisada apresentou valores de deleção para 5' delta, beta, 3' beta e 3' PHHF-6. Também é mostrado, para efeito de ilustração, um esquema do tamanho e posição aproximada das deleções Siciliana (13 379 pb) e da amostra, de aproximadamente 105 Kb.

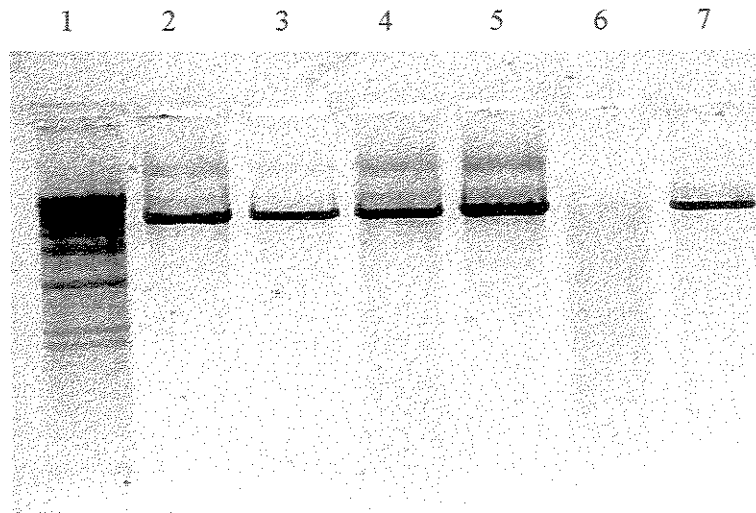


Figura 17. Imagem invertida do gel de agarose 0,9 %, corado com brometo de etídio, com fragmento contendo ponto de quebra. Os fragmentos, de aproximadamente 10Kb, foram amplificados com os primers E1 e HPF-1D e com enzima ELONGASE. Linha 1- marcador λ hind ; Linha 6 - controle; Linhas 2-5 e 7- pacientes.

a o sequenciamento do ponto de quebra, aplicamos, além dos primers utilizados para amplificar o fragmento de 10 Kb, outros primers com potenciais regiões presentes na sequência, considerados assim primers internos. Assim, foram utilizados os iniciadores E1 e HPF1D (reação com elongase), A1 e A3 (para PHHF-1), além de B1 e B3 (para PHHF-2). A análise do sequenciamento revelou, especialmente com o primer B3, constituir-se da deleção encontrada em populações negras (PHHF-2), de aproximadamente 105 Kb. As seqüências obtidas foram comparadas com as do cluster da beta globina (GI-455025/ GENE BANK) e da região correspondente ao ponto de quebra da PHHF-2 (GI-183848 e 32434/ GENE BANK). A seqüência está representada na Figura 18, e apresenta as mesmas características já descritas para a região do ponto de quebra desta deleção, como a região de homologia (AGT), no sítio específico de recombinação. Esta deleção não foi detectada com o rastreamento inicial (primers B1, B2 e B3).

A

5'-CAGCGAAATTTTCTATAAAAATTAAT AGT CACTTTTCTGCATAGTCCTGGAGG-3' Normal (5')
 |||||
 5'-CAGCGAAATTTTCTATAAAAGTTAAT AGT TACAGGATATGAAATAAAAATACA-3' Deleção
 |||||
 5'-TTAAACGATTTTAAAAAAATCAATAA AGT TACAGGATATGAAATAAAAATACA-3' Normal (3')

ma

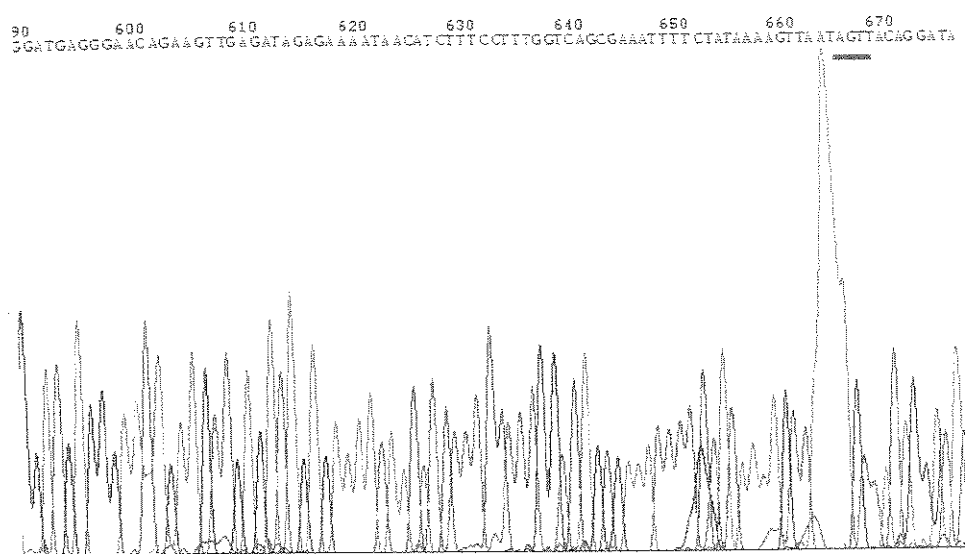


Figura 18. A – representação da sequência correspondente ao ponto de quebra da PHHF-2, em comparação com a região montante normal (cluster da beta globina- GI 455025/ GENE BANK) e jusante normal (gene para receptor olfativo- GI 11991862/ GENE BANK). Em destaque estão os três nucleotídeos que correspondem a região de homologia no sítio de recombinação. B – Eletroesferograma com a sequência do fragmento de 10Kb amplificado por PCR. A barra vermelha identifica a região de homologia (AGT).

5- DISCUSSÃO

5 - DISCUSSÃO

Os métodos tradicionais de investigação das deficiências gênicas são extremamente laboriosos, demandam muito tempo e, em geral, utilizam radioisótopos. A técnica mais freqüentemente utilizada, o *Southern-blot* (Southern, 1975), consiste basicamente em digerir o DNA com enzimas de restrição, separar os fragmentos em gel de agarose, transferir o DNA digerido para uma membrana de nylon ou nitrocelulose e hibridar com sondas marcadas com compostos radioativos, específicas para a região estudada. Os fragmentos observados após a revelação são comparados com fragmentos controles, quanto a tamanho e intensidade. Assim, pode-se inferir a localização aproximada dos pontos de quebra de grandes deleções gênicas. Esta técnica, todavia, requer DNA de alta qualidade, além de possuir aquelas características já mencionadas.

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permite amplificar uma região específica de DNA, utilizando iniciadores específicos e uma enzima polimerase termoestável (MacPherson e cols, 1995). Esta é, provavelmente, a técnica mais utilizada nos dias de hoje, em laboratórios de Biologia Molecular. Sua especificidade, flexibilidade e facilidade de execução, permite que seja utilizada em uma ampla variedade de atividades de pesquisa e diagnóstico, com relativa segurança e rapidez. Neste trabalho desenvolvemos procedimentos baseados na técnica de PCR para detecção de grandes deleções de DNA, por meio de três etapas principais.

A primeira delas se propôs a identificar deleções já conhecidas na literatura, através de um método descrito por Craig e cols., 1994. Para isto, utilizou iniciadores específicos, desenhados para flanquear os pontos de quebra, de forma a detectar, não só o fragmento mutante, bem como estados de heterozigose e homozigose. Assim, foram utilizados, na maioria dos casos, três iniciadores em uma única reação, de forma a amplificar um fragmento normal e um mutante, a depender de sua combinação (Figura 4).

Esta primeira abordagem identificou, de maneira nítida, a presença da deleção responsável pela ($\delta\beta$)^o-Talassemia Siciliana, em dois indivíduos estudados. As características descritas com o sequenciamento são as mesmas descritas por Henthorn e cols. (1990) e

Esposito e cols. (1994) e corroboram com a origem única da deleção Siciliana. Além disto, estes são os primeiros casos deste tipo de deleção identificados no Brasil. Interessante destacar que o paciente 1 possui uma β -Talassemia (IVS-II -110) e o paciente 2 a mutação responsável pela anemia falciforme (A→T, que leva a substituição Glu → Val no sexto resíduo da β -globina), sendo assim heterozigotos compostos para estas alterações e $(\delta\beta)^0$ -Talassemia Siciliana.

O Paciente 1 representa o primeiro caso da associação entre $(\delta\beta)^0$ -talassemia Siciliana e β -talassemia em que é descrita a alteração molecular. Como descrito previamente para pacientes com esta associação (Zulker *et al*, 1961; Wolff & Ignatov, 1963; Stamatoyanopoulos *et al*, 1969; Otolenghi *et al*, 1975; Necheles *et al*, 1969; Mezzadra *et al*, 1974; Katamis *et al*, 1973; Fessas *et al*, 1961; Gabuzda *et al*, 1963; Efremov *et al*, 1975; Brancati, 1973), o caso apresentado aqui possui talassemia intermediana, sem necessidade de transfusão regular.

Há poucos relatos envolvendo a associação entre Hb S e $(\delta\beta)^0$ -talassemia, com alteração molecular caracterizada (Trent *et al*, 1986, Mirabile *et al*, 1995). Embora o paciente 2, descrito neste trabalho, também possua um quadro clínico benigno, apresentou algumas crises vaso-oclusivas, as quais, aparentemente, não são freqüentes em outros casos descritos (Russo *et al*, 1963; Silvestroni & Bianco, 1964; Stamatoyanopoulos *et al*, 1967; Kinney *et al*, 1978; Zelkowitz *et al*, 1972; Altlay *et al*, 1977; Belhani *et al*, 1977).

A segunda etapa consistiu em rastrear outras deleções ao longo do cluster, através de uma método baseado no aspecto quantitativo do PCR. A técnica baseia-se na possibilidade de se identificar diferenças quantitativas na amplificação de amostras por PCR, em presença de deleções ou duplicações, onde o produto final de amplificação é diretamente proporcional à quantidade inicial de cópias da sequência alvo (Celi e cols, 1994; Abbs e Bobrow, 1991; Poropat e Nicholson, 1998; del Rio e cols, 1998). A possibilidade de utilização de primers marcados com fluorescência aumenta a sensibilidade e praticidade da técnica, já que podemos aplicar uma série maior de primers numa única reação (Multiplex), e automatizar os procedimentos de corrida e leitura das amostras (Yau e cols, 1996; Morgan e cols, 1999; Sherlock e cols, 1998). A leitura das amostras é feita em software apropriado (GeneScan-Applied Biosystems), que identifica os sinais (picos e áreas) emitidos pelo composto fluorescente incorporado aos primers. A área de cada pico de fluorescência alvo é comparada

com a área do pico controle (interno) diplóide (amplificada do gene da β actina), e outras regiões, para cálculo da dosagem gênica e identificação da deleção, em comparação com uma amostra controle. Assim, desenhamos uma série de pares de primers, marcados com composto fluorescente (6-FAM), ao longo do cluster da β -globina, que foram reunidos em reações de multiplex, para um rápido rastreamento de deleções nesta região.

Com este método, foi possível identificar a posição aproximada (Figura 16) dos pontos de quebra (montante e jusante) de uma deleção de aproximadamente 100Kb. Alguns valores mostraram variação entre os valores teóricos esperados (0.5 para deleções e 1 para regiões normais), o que pode representar artefatos técnicos em algumas amplificações, tanto em amostras, quanto em regiões específicas. Assim, recomendamos, não só a utilização de controles negativos e, se possível, positivos (deleções ou duplicações) já caracterizados, bem como a repetição em triplicata de cada reação.

A terceira abordagem metodológica objetivou a amplificação do fragmento que contem o ponto de quebra da deleção identificada pelo método anterior. Os iniciadores flanqueiam as regiões consideradas com CDG (coeficiente de dosagem gênica) para deleções (0.5). Neste caso, foi utilizada uma enzima especial, ELONGASE (Life Technologies), capaz de amplificar fragmentos longos de DNA (até 30Kb). Com isto, foi obtido um fragmento de aproximadamente 10Kb, que foi submetido a sequenciamento direto. O sequenciamento revelou a presença da deleção, inicialmente descrita em um indivíduo negro proveniente de Gana (Tuan e cols., 1980), responsável pelo quadro de Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal do tipo 2. Esta deleção tem aproximadamente 105 Kb e estava incluída na primeira abordagem, isto é, identificação pela amplificação do ponto de quebra, não tendo sido, porém, caracterizada. Craig e cols., 1994, comenta que, especificamente neste tipo de deleção, os iniciadores utilizados tiveram suas concentrações reajustadas, para que os fragmentos amplificados possuíssem a mesma intensidade. Neste caso, a concentração do iniciador B2, para região normal, teve que ser reduzida para 2 pmol. É possível, então, que os iniciadores utilizados em nossas reações estivessem em concentrações inadequadas, e o fato de não possuímos controles positivos para esta deleção, contribuiu para a não detecção deste tipo delecional com o primeiro método.

O ponto de quebra da PHHF-2 começa dentro do segundo intron (IVS2) do pseudogene ($\psi\beta$), e termina em um elemento L1, aproximadamente 105 Kb a jusante, em uma região codificante para receptores olfativos (HOR3' beta4 e HOR3' beta5 – GI 11991862/GENEBANK). Esta deleção está deslocada 5 Kb da PHHF-1, tanto 5' quanto 3', sem nucleotídeos órfãos e com uma região de homologia (AGT) no sítio específico de recombinação (Henthorn e cols., 1990). Esta alteração já havia sido descrita na população brasileira (Gonçalves e cols., 1995), e o fato de termos identificado em cinco indivíduos não relacionados de origem africana, indica possivelmente que esta deve ser o tipo mais frequente de PHHF no Brasil. Este dado é diferente daquele observado em populações de origem Africana nos Estados Unidos, onde o tipo delecional mais freqüente é PHHF-1 (Collins *et al*, 1987; Feingold & Forget, 1989). Os dados hematológicos dos indivíduos estudados neste trabalho são similares aos descritos por Gonçalves e cols, 1995.

Um dos mecanismos propostos para explicar como esta deleção promove um aumento de Hb F, de forma a compensar a perda dos genes envolvidos na expressão das cadeias adultas, sugere a justaposição de elementos acentuadores, localizados a jusante da deleção. Alguns estudos mostram que esta região, que possui genes que codificam receptores olfativos, possui atividade acentuadora e atua, provavelmente, através de uma modificação da estrutura cromatínica, tornando-a transcripcionalmente ativa (Feingold & Forget, 1989, Feingold *et al*, 1999; Anagnou *et al.*, 1995; Arcasoy *et al.*, 1997; Calzolari *et al.*, 1999; Elder *et al.*, 1990). Todavia, a simples localização de acentuadores nas proximidades 3' de deleções, parece não fornecer o único meio para aumento de Hb F, já que acentuadores também estão presentes em deleções responsáveis por β e $\delta\beta$ -talassemias. Desta forma, fatores adicionais devem contribuir para o significativo aumento de Hb F nos casos de PHHF, tais como presença de elementos silenciadores (Huisman *et al.*, 1974; Vitale *et al*, 1994), elementos competidores (Weatheral *et al*, 2001), ou que de alguma outra forma interfiram negativamente na expressão dos genes γ . A Figura 19 ilustra um modelo pelo qual diferentes deleções podem originar quadros clínicos distintos como PHHF e $\delta\beta$ -talassemias.

Em condições normais (A), o LCR, importante elemento responsável pela regulação dos genes do cluster β , interage (seguindo o modelo de "looping") com cada gene, a depender do estágio de desenvolvimento (ϵ no embrião, $G\gamma$ e $A\gamma$ no feto, δ e β no período adulto). Uma

primeira deleção (B) pode manter regiões competidoras pelo LCR, tais como os promotores dos genes δ e β , de maneira a aumentar a expressão de Hb F, porém não o suficiente para compensar a perda dos genes adultos. De forma alternativa, a deleção mantém regiões de efeito negativo para expressão dos genes fetais, como a região aproximadamente 3 Kb a montante do gene δ , que, segundo estudos recentes (Calzolari e cols, 1999; O'Neill e cols., 1999), está relacionada com a ativação da expressão de β , possivelmente através da interação com complexos protéicos, responsáveis pela ativação da cromatina. Neste tipo delecional, a expressão elevada de Hb F se dá em apenas algumas células (células F), de distribuição heterogênea (D), levando a um quadro clínico de $\delta\beta$ -talassemia.

Em uma segunda circunstância (C), a deleção, além de remover regiões potencialmente competidoras pelo LCR e regiões de efeito negativo, justapõe acentuadores em regiões suficientemente próximas aos genes fetais, de maneira a permitir um alto grau de expressão destes genes. O resultado é uma distribuição homogênea de células F, com quantidade suficiente para compensar a perda de genes para cadeias adultas (E). De qualquer forma, parece haver a participação de várias regiões, que somadas, contribuem para a regulação da expressão dos genes que codificam as cadeias globínicas do tipo β , o que destaca a complexidade da regulação de sua expressão gênica.

Além das deficiências gênicas, outras alterações moleculares podem levar a um aumento de Hb F, tais como mutações de ponto (Weatherall & Clegg 2001), polimorfismos relacionados com seqüências repetidas (Lapoumeroulie e cols., 1999), além de fatores não ligados ao cluster da β -globina, no cromossomo 11 (Craig e cols., 1997).

Este trabalho contribuiu para o desenvolvimento e aplicação de um método, particularmente mais rápido e de fácil execução, na investigação de deficiências gênicas (ou aumento do número de cópias), e que pode vir a ser utilizado no estudo de alterações, não só no cluster da β -globina, mas também em outros genes de interesse.

Além disto, os dados apresentados neste trabalho sobre a interação entre $(\delta\beta)^0$ -Talassemia Siciliana com β - Talassemia e Hb S representam os primeiros casos descritos no Brasil, com caracterização clínica e molecular. Também destaca-se a presença de PHHF do tipo 2, detectada em cinco indivíduos, e que sabidamente pode contribuir para melhorar a evolução clínica de determinadas condições, tais como β -talassemia e anemia falciforme.

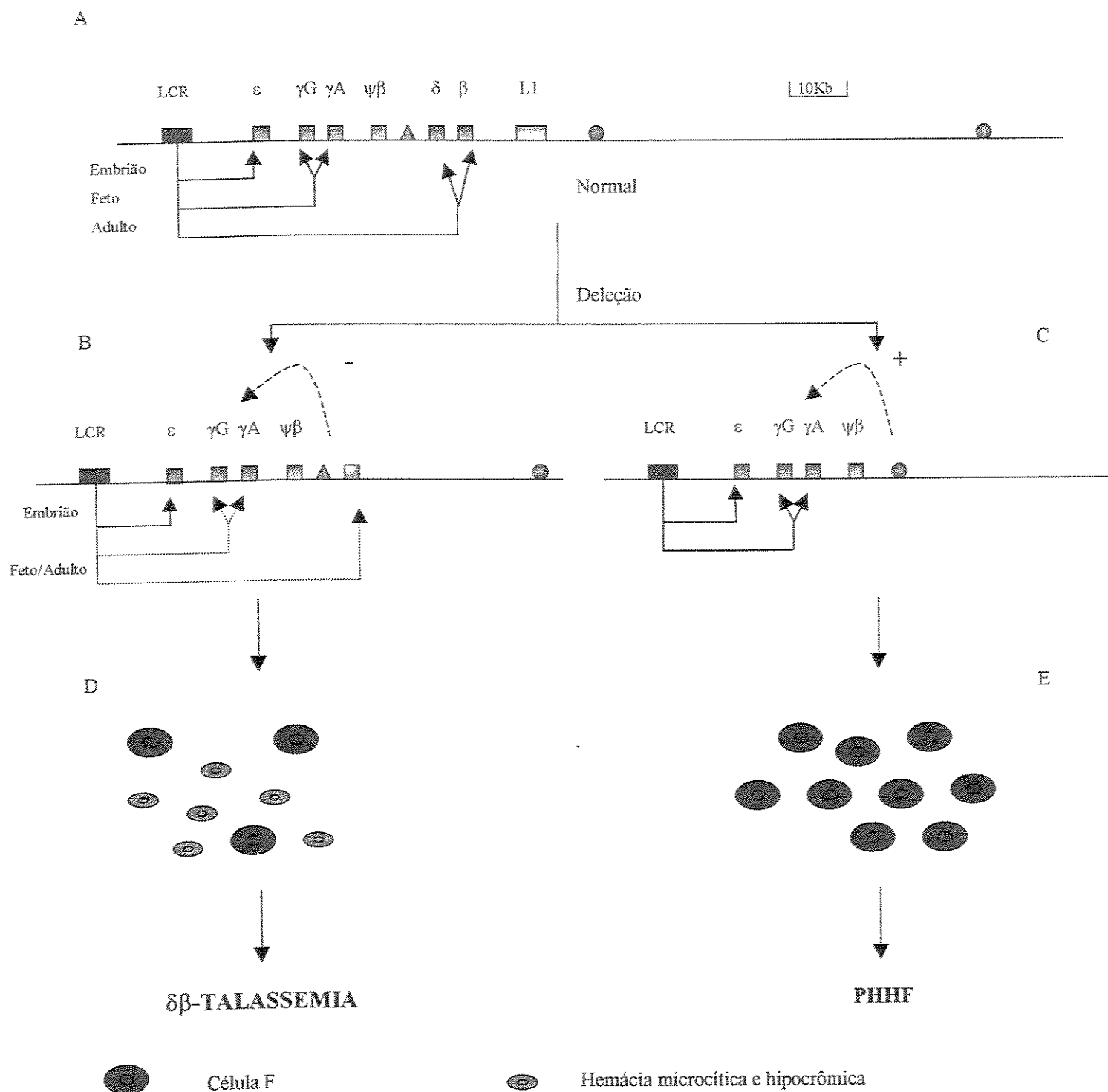


Figura 19. Modelo explicativo para o efeito de diferentes deleções no cluster da β globina. A – condição normal de expressão gênica. B – deleção responsável por um quadro clínico de $\delta\beta$ -talassemia. C – deleção responsável por um quadro de PHHF. D- distribuição heterocelular, com hemácias microcíticas e hipocrômicas. E – distribuição pancelular. Maiores explicações no texto.

6 - CONCLUSÕES

6 - CONCLUSÕES

6 . 1 - Os dados apresentados neste trabalho sobre a interação entre $(\delta\beta)^0$ -Talassemia Siciliana com β - Talassemia e Hb S representam os primeiros casos descritos no Brasil, com caracterização clínica e molecular;

6 . 2 - Também destaca-se a presença de PHHF do tipo 2, detectada em cinco indivíduos não relacionados, e que sabidamente pode contribuir para melhorar a evolução clínica de determinadas condições, tais como β -talassemia e anemia falciforme;

6 . 3 - Este trabalho contribuiu para o desenvolvimento e aplicação de um método, particularmente mais rápido e de fácil execução, na investigação de deficiências gênicas (ou aumento do número de cópias), e que pode vir a ser utilizado no estudo de alterações, não só no cluster da β -globina, mas também em outros genes de interesse.

7 - SUMMARY

7 - SUMMARY

Molecular analysis of gene deletions associated with Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin and ($\delta\beta$) – Thalassemia

Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin are a rare, heterogeneous and benign group of hereditary disorders with an abnormal switch from fetal to adult hemoglobin, resulting in high levels of Hb F in the adult stage. At a molecular level, they are divided in deletion and non-deletion forms. A total of six deletions related to HPFH have been described, associated with increased levels of both γ chains. Most ($\delta\beta$) – Thalassemias also arise from deletions in the β globin gene cluster, in some cases these deletions are very similar to those that originate HPFH. However, these forms demonstrate smaller increases in Hb F and are accompanied by microcytic and hypochromic red blood cells, in the heterozygote state. Three main hypothesis were proposed to explain the relationship between these deletions and the non-suppression of γ genes: the removal of competitive regions that interact with the LCR; the juxtaposition of enhancer elements; and the removal of silencers. Here we investigate the presence of gene deletions, associated with HPFH and ($\delta\beta$) – Thalassemia in blood donors at the Hemocenter and patients from the Clinical Hospital, Unicamp. For this, we developed a modification of a technique, described first in Duchenne/ Becker dystrophy, based on the possibility of identifying quantitative differences in the amplifications of samples by PCR, in the presence of deletion or duplication carriers, in which the final product of amplification is directly proportional to the initial amount of copies of the sequence targets. The method, employing fluorescence intensity for quantification, identified a deletion responsible for HPFH-2, in five individuals of African origin. We also identified, using specific primers that bridge the breakpoints, the presence of Sicilian ($\delta\beta$) – Thalassemia in two individuals that are compound heterozygous for (β) – Thalassemia and Hb S, respectively. The sequence analysis revealed the same characteristics described for these alterations. This study contributes to the development and application of an extremely rapid and practical method for the identification of deletions (or increase in gene copy number), which could be used in the study of alterations, not only in the β globin gene cluster, but also in other genes of interest. Moreover, the data

presented here regarding the alterations in Sicilian ($\delta\beta$) – Thalassemia in association with (β) – Thalassemia and HbS represents the first cases described in Brazil, with clinical and molecular characterisation. In addition, there is a strong presence of a benign alteration (HPFH-2), that can ameliorate some conditions, such as (β) – Thalassemia and Sickle Cell Disease.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBS, S. & BOBROW, M. Analysis of quantitative PCR for the diagnosis of deletion and duplication carries in the dystrophin gene, **J. Med. Genet.** **29**:191-196, 1991.

ALTER, B. P.; GOLL, S. C.; FRENOV, G. D.; GRAVELY, E.; HUISMAN, T. H. J. Globin chain electrophoresis: a new approach to the determination of the Gy/ Ay ratio of globin synthesis. **Br. J. Haematology** **44**: 525-534, 1980.

ALTLEY, C., SCHROEDER, W.A.; HUISMAN, T.H.J. The Gy- $\delta\beta$ -thalassemia and Gy- β^0 -HPFH conditions in combination with β -thalassemia and Hb S. **Am. J. Haematol.** **3**, 1, 1977.

ANAGNOU, N. P.; PAPAYANNOPOULOU, T.; STAMATOYANNOPOULOS, G.; NINHEIUS, A. W. Structurally diverse molecular deletions in the β -globin gene cluster exhibit an identical phenotype in interaction with the β^S -gene. **Blood** **65**: 1245-1251, 1985.

ANAGNOU, N. P.; PEREZ-STABLE, C.; GELINAS, R.; CONSTANTINI, F.; LIAPAKI, K.; CONSTANTOPOULOU, M.; KOSTEAS, T.; MOSCHONAS, N. K. E STAMATOYANNOPOULOUS, G. Sequences located 3' to the breakpoint of the hereditary persistence of fetal hemoglobin-3 deletion exhibit enhancer activity and can modify the developmental expression of the human fetal Ay-globin gene in transgenic mice. **J. Biol. Chem.**, **270** (17): 10256-10263. 1995

ARCASOY, M. O, ROMANA, M; FABRY, M.E; SKARPIDI, E; NAGEL, R.L; FORGET, B.G. High levels of human γ -globin gene expression in adult mice carrying a transgene of deletion-type hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Mol. Cell Biol.**, **17**: 2076-2089. 1997

- BELHANI M, DAHMANE M, RICHARD F, TRABUCHET G, COLONNA P; LABIE D. Aspects cliniques et biologiques des bêta-thalassémies. A propos de 176 observations. *Sem. Hôp. Paris.*, **53**, 891, 1977.
- BETKE, K.; MARTI, H. R.; SCHLICHT, I. Estimation of small percentage of foetal haemoglobin. *Nature* **184**: 1877-1878, 1959.
- BLAU, C. A. & STAMATOYANNOPOULOUS, G. REGULATION OF FETAL HEMOGLOBIN. *Sickle Cell Disease: Basic Principles and Clinical Practice*. Reven Press, LTd, New York, 1994.
- BOLLEKENS, J. A. & FORGET, B. G. $\delta\beta$ -thalassemia and Hereditary Persistence of Fetal hemoglobin. *Hematology/ Oncology Clinics of North America* **3** (5):399-422. 1991.
- BRADLEY, T. B. & RANNEY, H. M.: Acquired disorders of hemoglobin. In: Brown, E. B.: progress in Hematology, vol. VIII, Grune and Straton, New York, S. Francisco, London. Pp 77-98, 1973.
- BRANCATI C. Le microcitemie in provincia di Cozenza: aspetti diagnostici ed epidemiologici com particolare riguardo alle forme di α -microcitemie. In: *Atti del V Congresso sulle Microcitemia*, p. 334. Cozenza, 1973.
- BUNN, H. & FORGET, B. G. Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 1^a edição, 1986.
- BUNN, H. F. Reversing ontogeny. *New England Journal of Medicine*, **328**: 129-131. 1993

- BUNN, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, 377: 762-769. 1997
- BULGER, M. & GROUDINE, M. Looping versus linking: toward a model for globin gene activation. **Genes & Development**. 13:2465-2477. 1999
- CALZOLARI, R.; MCMORROW, T.; YANNOUTSOS, N.; LANGEVELD, A. ; GROSVELD, F. Deletion of a region that is a candidate for the difference between the deletion forms of hereditary persistence of fetal hemoglobin and $\delta\beta$ -thalassemia affects β - but not γ -globin gene expression. **EMBO J.**, 18 (4):949-958. 1999
- CAMASCHELLA, C.; SERRA, A.; GOTTARDI, E.; ALFARANO, A.; REVELLO, D.; MAZZA, U.; SAGLIO, G. A new hereditary persistence of fetal hemoglobin has the breakpoint within the 3' β -globin gene enhancer. **Blood**, 74 (4):1000-1005.1990
- CAMASCHELLA, C.; SERRA, A.; SAGLIO, G.;BAIGET, M.; MALGARETTI, N.; MANTOVANI, R.; OTTOLENGHI, S.The 3' ends of the deletions of Spanish $\delta\beta^0$ -Thalassemia and black HPFH 1 and 2 lie within 17 kilobases. **Blood**, 70 (2):593-596. 1987
- CELLI, FS; COHEN, MM; ANTONARAKIS, SE; WERTHEIMER, E; ROTH, J.; SHULDINER, AR.: Determination of gene dosage by a quantitative adaptation of the polymerase chain reaction (qd-PCR): rapid detection of deletions and duplications of gene sequences. **Gemomics**. 21:304-310, 1994.
- COLLINS, F. S.; COLE, J. L.; LOCKWOOD, W. K.; IANNUZZI, M. C. The deletion in both common types of hereditary persistence of fetal hemoglobin is approximately 105 kilobases.**Blood**, 70 (6):1797-1803. 1987

- CRAIG, J. E.; BARNETSON, R. A.; PRIOR, J.; RAVEN, J. L.; THEIN, S. L. Rapid detection of deletions causing $\delta\beta$ Thalassemia and Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin by enzymatic amplification. **Blood**. **86** (6):1673-1682. 1994
- GRAIG, J. E.; ROCHETTE, J.; SAMPIETRO, M.; WILKIE, A. O.; BARNETSON, R.; HATTON, C. S.; DEMENAI, F.; THEIN, S. L.: Genetic heterogeneity in heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Blood**. **90**(1): 428-34, 1997.
- DACIE, J. V. & LEWIS, S. M. Practical haematology. 6th ed.. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Mulbourne, New York, 1984.
- DEL RIO, T; URBÁN, Z; CSISZÁR, K.; BOYD, CD.: A gene dosage PCR method for detection of elastin gene deletions in patients with Williams syndrome. **Clin Genet.**, **54**: 129-135, 1998
- EFREMOV GD, NICOLOV N, DUNA H, SCHOEDER WA, MILLER A; HUISMAN THJ. $\delta\beta$ -Thalassemia in two Yugoslavian families: **Scand. J. haematol** **14**, 226, 1975.
- ELDER, J. T.; FORRESTER, W. C. ; THOMPSON, C.. Translocation of an erythroid-specific hypersensitive site in deletion type hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Mol. Cell Biol**. **10**: 1382-1389. 1990
- ERLICH, H. A. PCR Technology: principles and applications for DNA amplification. Stockton press, New York, 1989.
- ESPOSITO, G, GROSSO, M., GOTTARDI, E., IZZO, P., CAMASCHELLA, C., SALVATORE, F.: A Unique origin For Sicilian ($\delta\beta$)^o- Thalassemia in 33 Unrelated Families and its Rapid Diagnostic Characterization by PCR Analysis. **Human Genetics**, **93**: 691-693, 1994.

FEINGOLD, E. A. & FORGET, B. G. The breakpoint of a large deletion causing hereditary persistence of fetal hemoglobin occurs within an erythroid DNA domain remote from the β -globin gene cluster. **Blood**, 74 (6):2178-2186. 1989

FEINGOLD, E. A.; PENNY, L. A.; NIENHUIS, A. W.; FORGET, B. G. An olfactory receptor gene is located in the extended human β -globin gene cluster and is expressed in erythroid cells. **Genomics**, 61:15-23. 1999

FESSAS P, STAMATOYANNOPOULOS G; KARAKLIS A . Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin and its combination with alpha and beta- thalassemia. In: 8th Congress of the european society of haematology. P. 302. Karger; Basel, Viena, 1961.

FORGET, B. G. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Ann N Y Acad. Sci.** 850:38-44. 1998

FORGET, B. G. Developmental control of human globin gene expression. **Prog. Clin. Biol. Res.**, 352:313-322. 1990.

GABUZDA TG, NATHAN DG; GARDNER FH . The turnover of hemoglobins A, F and A2 in the peripheral blood of three patients with thalassemia. **J. Clin Invest.** 42, 1678, 1963.

GONÇALVES, M. S. Caracterização molecular da persistência hereditária da hemoglobina fetal e da $\delta\beta$ -talassemia em uma população brasileira.. Tese-Doutorado-Universidade Estadual de Campinas. Campinas, S.P.,150p.,1993.

GONÇALVES, M. S, FAHEL, S.; FIGUEIREDO, M. S.; KIMURA, E. J.; NECHTMAN, F.; STOMING, T. A; ARRUDA, V. R.; SAAD S. T. O.; COSTA, F. F. Molecular identification of hereditary persistence of fetal hemoglobin type 2 (HPFH type 2) in patients from Brazil. **Ann. Hematol.** 70: 159-161, 1995.

HENTHORN, P. S.; MAGER, D. L.; HUISMAN, T. H. J. A gene deletion ending within a complex array of repeated sequences 3' to the human β -globin gene cluster. **Proc. Natl Acad Sci USA**, **83**: 5194-5198. 1986

HENTHORN, P.; SMITHIES, O.; MAGER, D. L. Molecular analysis of deletions in the human β -globin gene cluster: deletion junctions and locations of breakpoints. **Genomics**. **6**:226-237. 1990

HUISMAN, T.; SCHROEDER, W.; EFREMOV, G.; DUMA, H.; MLADENOVSKI, B.; HYMAN, C.; RACHMILEWITZ, E.; VOLVER, N.; MILLER, H.; BRODIE, A.; SHELTON, J. R.; SHELTON, J. B; APPEL, G. The present status of the heterogeneity of fetal hemoglobin in β -thalassemia: an attempt to unify some observations in thalassemia and related conditions. **Ann. N Y Acad Sci**, **232**: 107-124. 1974

JANE, S. M. Understanding fetal globin gene expression: a step towards effective Hb F reactivation in haemoglobinopathies. **Bri. J. Haematology**. **102**: 415-422. 1998

KATAMIS C, METATAXATOU-MAUROMATI A, KARAMBOULA K, NASIKA E & LEHMANN H. The clinical and hematological findings in children inheriting two types of thalassemia: high A2 type, beta-thalassemia and high F-type or delta-beta-thalassemia. **Br. J. Haematol**. **25**, 375, 1973.

KINNEY TR, FRIEDMAN SH, CIFUENTES E, KIN HC; SCHWARTZ E . Variations in globin synthesis in delta-beta-thalassemia. **Br. J. Haematol**. **38**, 15, 1978.

KOSTEAS, T.; PALENA, A.; ANAGNOU, N. P. Molecular cloning of the breakpoints of the hereditary persistence of fetal hemoglobin type-6 (HPFH-6) deletion and sequence analysis of the novel juxtaposed region from the 3' end of the β -globin gene cluster. **Hum Genet.**, **100**:441-445. 1997

KUTLAR, A. & LANCLOS, K. D. The thalassemia repository. **Hemoglobin**, 11:93-109. 1987.

KUTLAR, A.; GARDINE, M. B.; HEADLEAU, M. G.; REESE, A. L.; CLERK, M. P.; NAGLE, S.; SUKUMARAN, P. K.; HUISMAN, T. H. J. Heterogeneity in the molecular basis of three types of HPFH and the relative synthesis of G γ and A γ types of γ chain. **Biochem. Genet.**, 22: 21-35. 1984

LAPOUMEROULIE, C., CASTIGLIA L.; RUBERTO, C.; FICHERA, M.; AMATA, S.; LABIE, D.; RAGUSA, A.: Genetic variations in human fetal globin gene microsatellites and their functional relevance. **Hum Genet.** 104(4):307-14, 1999.

MANIATTIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBRROK, J. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory-2^a ed. 1989.

McNAUGHTON, J. C. ; COCKBURN, D. J.; HUGHES, G.; JONES, W. A; LAING, N. G.; RAY, P. N.; STOCKWELL, P. A; PETERSEN, G. B. Is gene deletion in eukaryotes sequence-dependent? A study of nine deletion junctions and nineteen other deletion breakpoints in intron 7 of the human dystrophin gene. **Gene**, 222:41-51 , 1998.

McPHERSON, M. J; HAMES, B. D. ; TAYLOR, G. R. PCR 2: a practical approach. *The practical approach series*. IRL Press, New York. 1995.

MEZZADRA G, GUARNIERI B; SCHILIRO G. Contributo allo studio dell ucera talassemica: **Rif. Med.** 88, 8, 1974.

MIRABILE E, TESTA R, CONSALVO C, DICKERSHOFF R; SCHILIRO G. Association of HbS/ Hb Lepore and $\delta\beta$ -thalassemia/ Hb Lepore in Sicilian patients: review of the presence of Hb Lepore in Sicily. **Eur. J. Haematol** 55, 126, 1995.

MULLIS, K. B. & FALCONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalysed reaction. **Methods Enzymol.**, **155**:335-345. 1987

MORGAN, NV; TIPPING, AJ; MATHEW, CG: High frequency of large intragenic deletions in the Falconi Anemia Group A Gene. **Am. J. Hum. Genet.**, **65**:1330-1341, 1999.

NECHELES TF, ALLEN DM; FINKEL HF. *Clinical Disorders of Hemoglobin Structure and Synthesis*. Appleton Century Crofts, New York, 1969.

O'NEILL, D.; YANG, J.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; BORNSCHLEGEL, K.; TEMPST, P.; BANK, A. Tissue-specific and developmental stage-specific DNA binding by a mammalian SWI/SNF complex associated with human fetal-to-adult globin gene switching. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **96**:349-354, 1999.

OTTOLENGHI S, LANYON WG, WILLIANSOON R, WEATHERAL DJ, CLEGG JB; PITCHER CS. Human globin synthesis for a patient with $\beta/\delta\beta$ thalassemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **72**, 2294, 1975.

OTTOLENGHI, S.; GIGLIONI B.; CONI, P.; GIANNI, A. M.; POLLI, E.; ACQUAYE, C. T. A.; OLDHNM, J. A; MASERA, G. Globin gene deletion in HPFH, $\delta\beta$ -thal and Hb Lepore disease. **Nature**, **278**:654-657. 1979

POROPAT, RA & NICHOLSON, GA: Determination of gene dosage at PMP22 and androgen receptor loci by quantitative PCR. **Clinical Chemistry**, **44** (4): 724-730, 1998.

ROTH, D. B.; PORTER, T. N; WILSON, J. H. Mechanisms of non-homologous recombination in mammalian cells. **Mol. Cell Biol**, **5**: 2599-2607. 1985

- ROTH, D. B. & WILSON, J. H. Non-homologous recombination in mammalian cells: role of short sequence homologies in the joining reaction. *Mol. Cell Biol*, **6**: 4295-4304. 1986.
- RUSO, G; LA GRUTTA, A; KOLLICA F . Sulla eterogenetica della talassemia. Contributo casistico ed interpretazione biochimica e genetica. *Riv. Pediatr. Sicil* P18, 239, 1963.
- SAIKI, R. K.; GEELFOND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B. ; ERLICH, H. A. Primer directes enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487-491. 1988.
- SAGLIO, G.; CAMASCHELLA, C.; SERRA, A.; BERTERO, T.; CAMBRIN, G. R.; GUERRASIO, A.; MAZZA, U.; IZZO, P.; TERRAGNI, F.; GIGLIONI, B.; COMI, P. E OTTOLENGHI, S. Italian type of deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Blood*, **68** (3):646-651. 1986.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**:618-619. 1977.
- SERJEANT, G. R. & SERJEANT, B. E. Sickle Cell Disease. 3 ° Ed. Oxford Medical Publications, New York, 2001.
- SHERLOCK, J; CIRIGLIANO, V.; PETROU, M.; TUTSCHEK, B.; ADINOLF, M.: Assessment of diagnostic quantitative multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells. *Ann. Hum. Genet*, **62**:9-23, 1998.
- SHIOKOWA S.; YAMADA H.; Taki hard Y. Molecular analysis of japanese $\delta\beta^0$ -thal.. *Blood*, **72**: 1771-1775, 1988.

- SILVESTRONI E & BIANCO I . Un caso di malattia microhepanocitica da Hb E e varietà di microcitemia con quota normale di A2 e quota elevata di Hb F. **Prog. Med. Roma.** **20**, 509, 1964.
- SOUTHERN, E. M.; detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.**, **98**: 503, 1975.
- STAMATOYANOPPOULOS G, SOFROMIADOU C & AKRIVAKIS A . Absence of hemoglobin A in a double heterozygote for F-thalassemia and hemoglobin S. **Blood.** **30**, 772, 1967.
- STAMATOYANOPPOULOS G, FESSAS P ; PAPAYANNOPOULOU T F-thalassemia: a study of thirty-one families with simple heterozygotes and combination of F-thalassemia and A2-thalassemia. **Am. J. Med.** **47**, 194, 1969.
- STAMATOYANNOPOULOS, G. & NIENHUIS, A. W. Hemoglobin switching. *Molecular basis of blood diseases*. 2ª edição (ed. Stamatoyannopoulos *et al.*) pp. 107-156. Saunders, Philadelphia. 1994
- TRENT RJ, SVIRKLYS L, HARRIS MG, HOCKING DR; KRONENBERG H. ($\delta\beta$)^o thalassemia of the southern italian type. Its geographical origin and interaction with the sickle cell gene. **Pathology**, **18**: 117-122, 1986.
- TRENT R. J.; SVIRKLYS L.; JONES P. Thai $\delta\beta$ -thal and its interaction with γ -Thal. **Hemoglobin**, **12**: 101-110, 1988.
- TUAN, D.; MURNAME, M J.; DE RIEL, J. K.; FORGET, B. G. Heterogeneity in the molecular basis of HPFH. **Nature**, **285**: 335-337, 1980.

TUAN, D.; FEINGOLD, E.; NEWMAN, M.; WEISSMAN, S. M.; FORGET, B. G.
Different 3' end points of deletions causing $\delta\beta$ -thalassemia and hereditary persistence
of fetal hemoglobin: implications for the control of γ -globin gene expression in man.
Proc. Natl. Acad. Sci USA, **83**:6937-6941. 1983

VITALE, M.; MARZO, R.; CALZOLARI, R.; ACUTO, S.; O'NEILL, D.; BANK, A;
MAGGIO, A .Evidence for a globin promoter-specific silencer element located
upstream of the human δ -globin gene. **Biochemical and Biophysical Research
Communications**. **204** (1): 413-418, 1994.

WEATHERAL, DJ & CLEGG, JB: *The Thalassemia Syndromes*. Oxford, Blackwell
Science Ltd, 4th ed., 2001.

WIJGERD, M.; GROSVELD, F. E FRASER, P. Transcription complex stability and
chromatin dynamics in vivo. **Nature**. **377**:209-213, 1995.

WINICHAGOON, P.; FUCHAROEN, S.; THONGLAIROAN, V. ; WASI, P. Thai G γ
(A $\gamma\delta\beta$) $^\circ$ thalassemia and its interaction with a single γ -globin gene on a chromosome
carryng β° thalassemia. **Hemoglobin**, **14**:185-197. 1990.

WOLFF JA & IGNATOV VG. Heterogeneity of thalassemia major. **Am. J. Dis. Child**.
105, 235, 1963.

YAU, S. C.; BOBROW, C; MATHEW, C, G.; ABBS, S. J.: Accurate Diagnosis of carries
od deletions and duplications in Duchenne/ Becker musculae dystrophy by fluorescent
dosage analysis. **J. Med. Genet.**, **33**:550-558, 1996.

ZHANG J.W.; STAMATOYANNOPOULOS G.; ANAGNOU P. Laotian ($\delta\beta$) $^\circ$ -thal.
Molecular characterization of anovel deletion associated with increased production of
HbF. **Blood**, **72** (3): 983-988, 1988.

ZELKOWITZ L, TORRES C, BHOOPALAN N, YAKULIS VJ & HELLER P. Double heterozygous $\delta\beta$ -Thalassemia in Negroes. **Arch. Intern. Med.** 129, 975, 1972.

ZENG, Y. T.; HUANG, S. Z.; CHEN, B; LIANG, Y. T; CHANG, Z. M.; HERANO, T.; HUISMAN, T. H. J. HPFH or $(\delta\beta)^\circ$ thal. Three types observed in South Chinese families. **Blood** 66: 1430-1434. 1985

ZUELKER WW, ROBINSON AR & BOOKE CR. Reciprocal relationship of hemoglobins A₂ and F in beta chain thalassemias: a key to the genetic control of hemoglobin F. **Blood**. 17, 393, 1961