

SIMONE BORDIGNON DE JORGE

***OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE SSCP (SINGLE
STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM) PARA
TRIAGEM DE MUTAÇÕES NOS GENES DA
GLOBINA α HUMANA***

CAMPINAS

2002

SIMONE BORDIGNON DE JORGE

***OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE SSCP (SINGLE
STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM) PARA
TRIAGEM DE MUTAÇÕES NOS GENES DA
GLOBINA α HUMANA***

*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

CO-ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Mônica Barbosa de Melo

CAMPINAS

2002

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

J768o

Jorge. Simone Bordignon de

• Otimização da técnica de (" Single strand conformation polymorphism") SSCP para triagem de mutações nos genes da globina alfa humana. / Simone Bordignon de Jorge. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

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

1. Hemoglobinopatia. 2. Hemoglobina. 3. Mutação (Biologia).
I. Maria de Fátima Sonati. II. Mônica Barbosa de Melo . III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

UNIDADE	80
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	57688
V	EX
TOMBO BC/	54850
PROC.	16-724103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	24/07/03
Nº CPD	

CM00187010-4

BIB ID 295534

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a).

Maria de Fátima Sonati

Membros:

1. Maria de Fátima Sonati

2. Carmem Silvia Bertuzzo

3. Mara Helena Hutz

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 20/11/2002

DEDICATÓRIA

À minha mãe e meu irmão Alex pelo apoio, confiança, compreensão e todo amor que sempre me deram. Tiveram fundamental importância na realização deste trabalho ao suprir o amor, a presença e o carinho nos momentos de ausência para minha filhinha Beatriz.

Ao meu pai (in memoriam), pela história que deixou, e pelo exemplo que tentei seguir.

Ao meu marido Léo, por ter me apoiado sempre, estando ao meu lado com sua compreensão e seu amor, sem os quais este trabalho não teria chegado ao fim.

À minha filha Beatriz, minha maior incentivadora nas horas difíceis, sempre meiga e carinhosa, com seu sorriso sempre feliz, que suportou, muitas vezes, minhas ausências, compartilhando, sempre comigo, esta experiência.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Maria de Fátima Sonati pela confiança e orientação, além da minha introdução ao “mundo” da Biologia Molecular.

À Prof^ª. Mônica B. Melo pela colaboração neste trabalho.

Aos alunos e funcionários do laboratório de Hematologia do Departamento de Patologia Clínica que colaboraram com a execução deste trabalho.

À Ângela, Dulcinéia e Ucha do laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro, pelo apoio técnico.

Ao Péricles do Apoio Didático, Científico e Computacional, pela ajuda e esclarecimentos.

À efêmera passagem da Gisele, que alegrou o laboratório. Ao apoio da Simone Santana.

Às Carmens Silvias pelas conversas, amizade e carinho.

Em especial à Nadia, Denise e Dani, pela grande amizade. Por todos os risos e por todas as lágrimas compartilhadas. Por todo o carinho, sempre. Por toda ajuda em períodos difíceis. À Nadia, também, pelos “céus de boca cortados” no Clésio, pelas infinitas “terapias”, pelas infinitas risadas... Amigas que encontrei no meio deste trabalho, que me deram força, muita alegria e acima de tudo, uma grande amizade!

	<i>Pág</i>
RESUMO	<i>x</i>
ABSTRACT	<i>xii</i>
INTRODUÇÃO	14
1. As Hemoglobinas Humanas.....	15
2. Os Genes das Globinas.....	19
3. Mutações.....	21
3.1. Hemoglobinopatias.....	22
4. Métodos Utilizados para Detecção de Mutações Gênicas.....	22
4.1. DGGE - <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>	24
4.2. CSGE – <i>Conformation Sensitive Gel Electrophoresis</i>	26
4.3. SSCP – <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>	28
OBJETIVOS	32
CAPÍTULO I- “Screening for Mutations of the Human α-Globin Genes by Non Radioactive SSCP” (submetido à publicação no <i>Brazilian Journal of Medical and Biological Research</i>).....	34
DISCUSSÃO	42
CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXO I	52

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGNIFICADOS

AH	Análise de Heteroduplexes
BAP	bis-acrilolipiperazina
Confôrmeros	seqüências que formam diferentes conformações estáveis, aparecendo como bandas de diferentes mobilidades eletroforéticas
CSGE	<i>Conformation Sensitive Gel Electrophoresis</i>
2,3-DPG	2,3-difosfoglicerato
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
Duplex de DNA	fita dupla de DNA
DNTPs	desoxinucleotídeos trifosfatados
Hb	Hemoglobina
Heteroduplex	fitas duplas de DNA contendo bases não-complementares resultantes do pareamento entre uma fita normal e uma fita mutante
Homoduplex	fitas duplas de DNA, mutantes ou normais, com seqüências totalmente complementares
Hs	horas
IVS	Intron
Kb	kilo base de DNA
LIS	<i>Low Ionic Strength</i>

MDE	<i>Mutation Detection Enhancement</i>
Min	minutos
“Mismatch”	incorporação de bases não-complementares em uma fita dupla de DNA
Pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
RNA	ácido ribonucléico
Seg	segundos
SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
Vhs	volts/hora

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
FIGURA 1 :	15
FIGURA 2 :	16
FIGURA 3 :	17
FIGURA 4 :	18
FIGURA 5 :	19
FIGURA 6 :	20
FIGURA 7 :	20
FIGURA 8.:	25
FIGURA 9 :	26
FIGURA 10 :	27
FIGURA 11 :	29
FIGURA 12 :	31



RESUMO

Mutações de ponto e pequenas inserções ou deleções nos genes da globina α humana podem produzir variantes estruturais de cadeia α e α -talassemia. As mutações podem ser identificadas tanto pelo sequenciamento total dos genes, como por métodos de triagem, os quais selecionam o exon mutado para, então, ser seqüenciado. Embora sejam pequenos (cerca de 1Kb, com 3 exons e 2 introns), os genes da globina α são duplicados (α_2 and α_1) e extremamente ricos em ligações G-C, o que torna difícil a desnaturação e reduz a eficiência do sequenciamento, causando freqüentes artefatos e necessidade de repetições. Como o sequenciamento é ainda um método demorado e de custo elevado para muitos laboratórios, nós modificamos algumas condições do Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) com o intuito de otimizar a triagem de mutações nos genes da globina α humana.



ABSTRACT

Point mutations and small insertions or deletions in the human α -globin genes may produce α -chain structural variants and α -thalassemia. Mutations can be detected either by direct sequencing of the whole gene or by screening methods, which select the mutated exon for sequencing. Although small (around 1 Kb, 3 exons and 2 introns), the α -globin genes are duplicate (α_2 and α_1) and extremely G-C rich, what makes them difficult to denature and reduces sequencing efficiency, causing frequent artifacts and the need of repetitions. As DNA sequencing is still a time-consuming and expensive method for many laboratories, we modified some conditions of the Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) in order to optimize mutation detection in the α -globin genes.



INTRODUÇÃO

1. AS HEMOGLOBINAS HUMANAS

As hemoglobinas (Hbs) são pigmentos respiratórios especializados no transporte de oxigênio para os tecidos, encontrados em alta concentração dentro dos eritrócitos. São proteínas conjugadas, de peso molecular em torno de 64.000 Daltons, compostas por dois pares de cadeias polipeptídicas (globinas), associadas, cada uma delas, a um grupo heme, formado por um anel tetrapirrólico com um átomo de ferro no estado ferroso na posição central (Bunn e Forget, 1986; Alberts e cols, 1997) [Figuras 1 e 2].

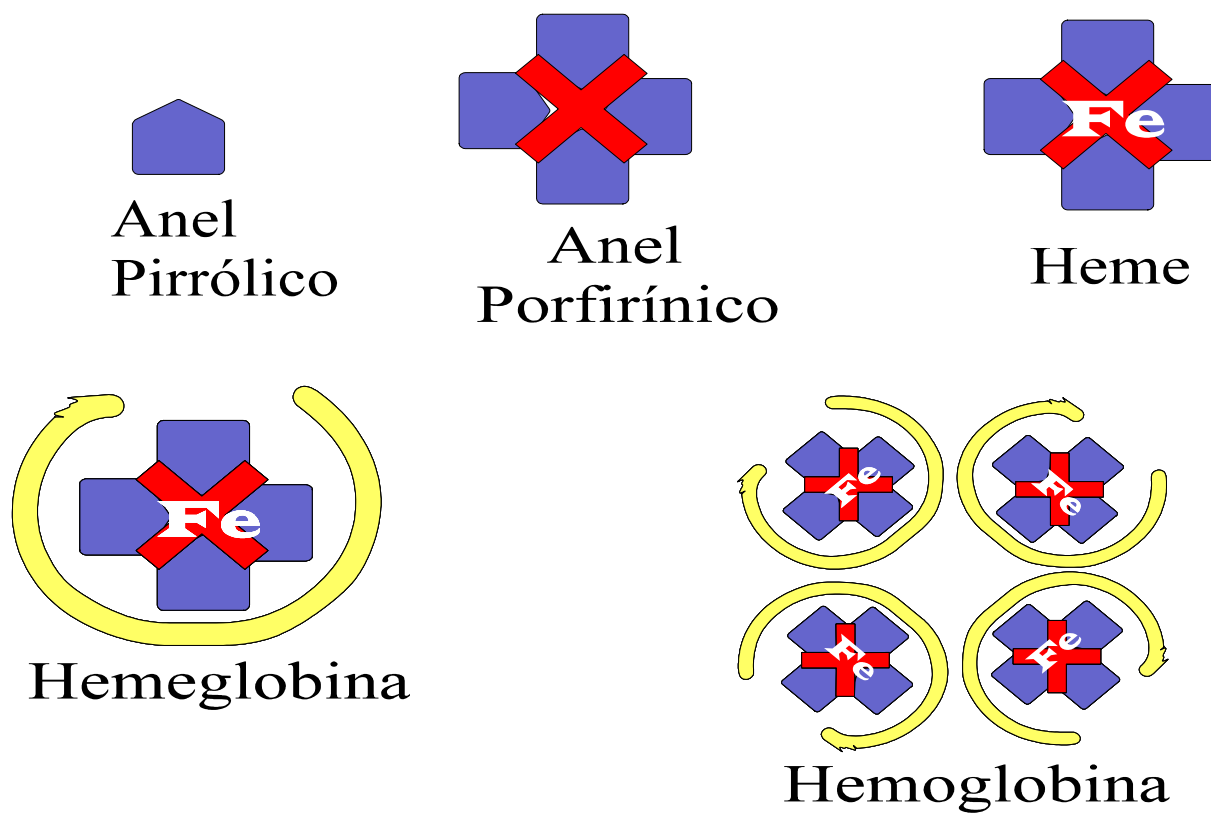


Figura 1. Representação esquemática dos constituintes da Hb.

A Molécula de Hemoglobina

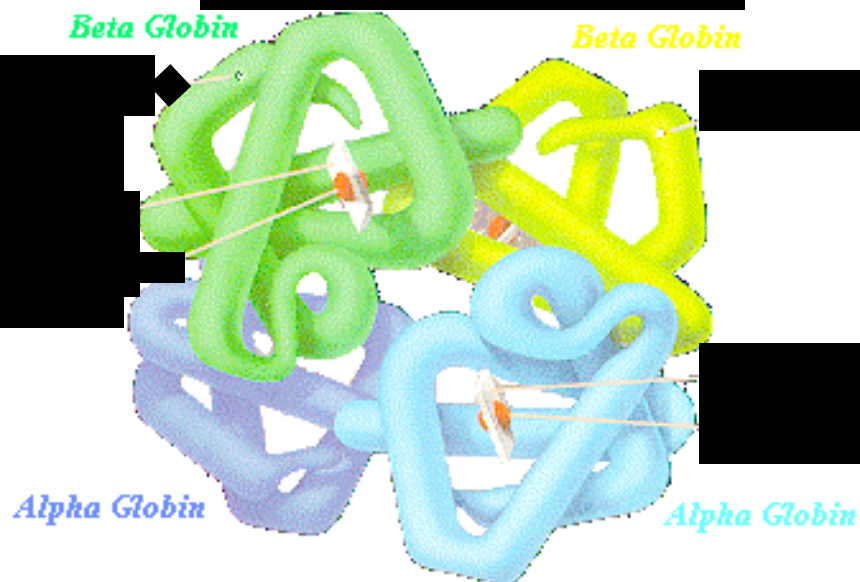


Figura 2. Representação da molécula de hemoglobina.

A síntese das Hbs inicia-se ainda na vida intra-uterina, no saco vitelínico, fase denominada de mesenquimal, que é seguida da fase visceral, ocorrida no fígado e no baço. Na vida pós-natal, a síntese ocorre na medula óssea (fase medular), durante a fase pré-eritroblástica da diferenciação eritrocitária (Bunn e Forget, 1986).

As Hbs produzidas durante os diferentes períodos (embrionário, fetal e adulto) possuem diferentes afinidades pelo oxigênio. Esta propriedade se deve às necessidades de cada ocasião, que requerem diferentes tipos de Hb (Higgs, 1993; Lewin, 1997). [Figura 3]

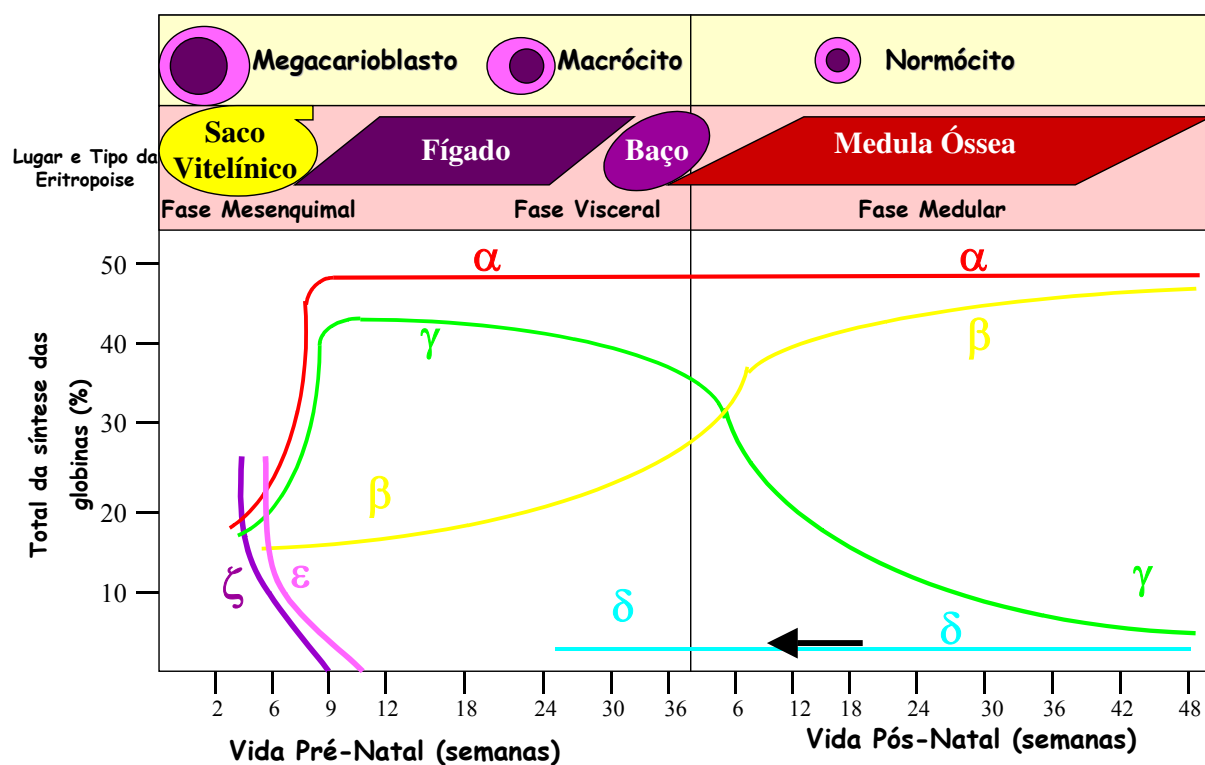


Figura 3. Representação gráfica da produção diferencial das Hbs durante o desenvolvimento e o “switch” das Hbs, indicado pela seta.

Existem seis tipos de cadeias globínicas: α , β , γ , δ , ϵ e ζ (Bunn e Forget, 1986), cuja combinação é responsável pelos diferentes tipos de Hbs. As cadeias α e ζ possuem 141 aminoácidos [Figura 4], enquanto que as cadeias β, γ, δ e ϵ possuem 146 aminoácidos (Higgs, 1993).

Dentre as Hbs normais temos: Hb Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$), Hb Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) e Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$), pigmentos respiratórios do período embrionário, a Hb Fetal (ou F- $\alpha_2\gamma_2$), que predomina durante todo o período fetal, e as Hbs A (ou A₁ - $\alpha_2\beta_2$), - e A₂ ($\alpha_2\delta_2$), da vida adulta, a primeira compondo cerca de 95% e a segunda de 2 - 3% do total de Hb, respectivamente (Bunn e Forget, 1986).

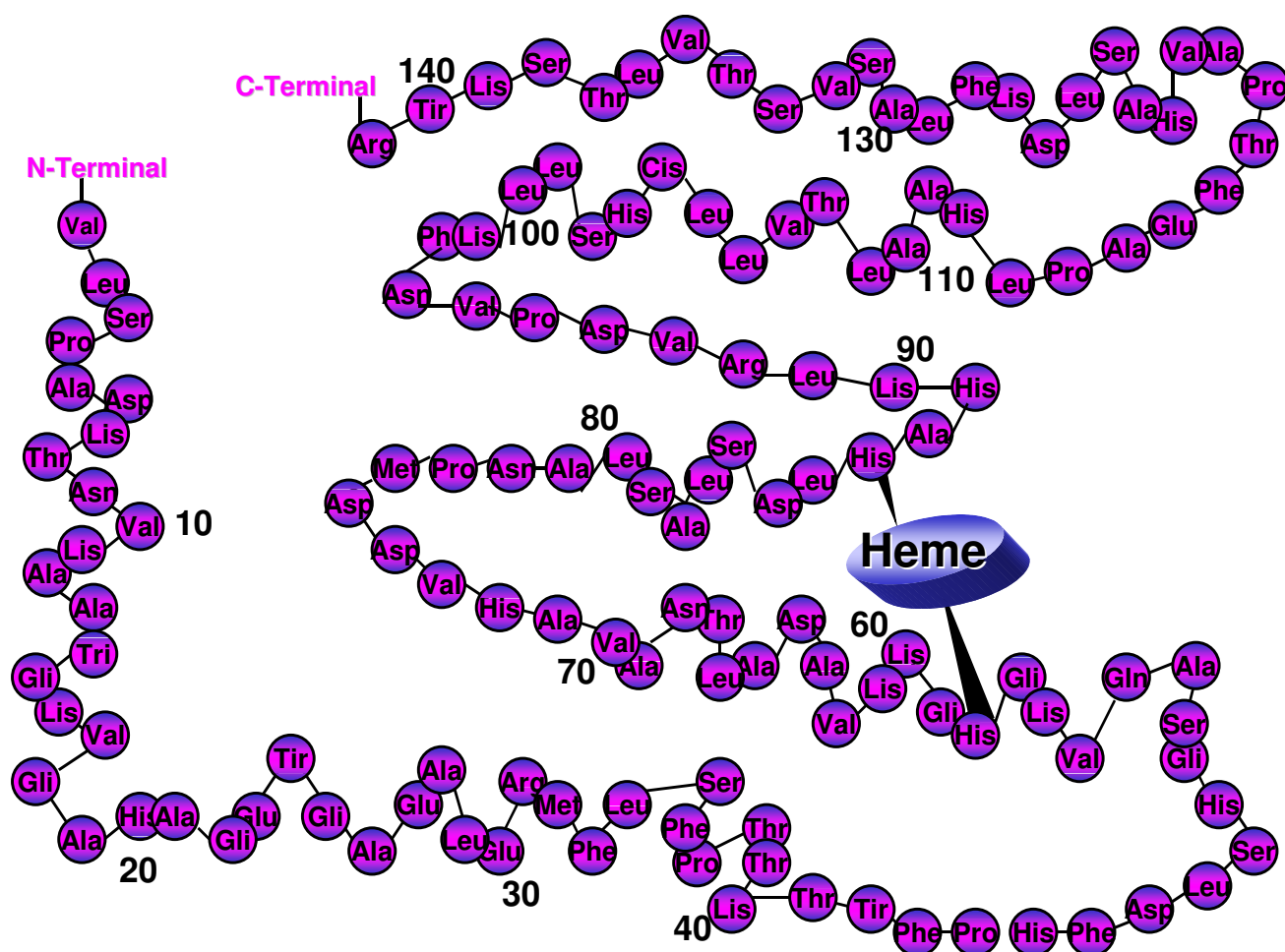


Figura 4. Representação da cadeia globínica α contendo seus 141 aminoácidos e a ligação com a molécula do heme.

2. OS GENES DAS GLOBINAS

Para que o tipo e a produção de Hb em cada estágio do desenvolvimento seja adequada, existe o comando de genes responsáveis pela síntese equilibrada das cadeias, que se expressam diferencialmente na vida pré e pós-natal (Bunn e Forget, 1986).

A síntese é controlada, portanto, por genes organizados dentro de agrupamentos. O grupamento α , localizado no braço curto do cromossomo 16 (16p 13.3) contém os genes ζ_2 , α_2 e α_1 , os pseudogenes $\psi\zeta$, $\psi\alpha_2$, $\psi\alpha_1$ e o gene θ_1 na seguinte ordem: 5' - ζ_2 , $\psi\zeta$, $\psi\alpha_2$, $\psi\alpha_1$, α_2 , α_1 , θ_1 - 3'. O grupamento β , localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p 15.5) contém os genes ϵ , γ^G , γ^A , δ e β e o pseudogene $\psi\beta$, na seguinte ordem: 5' - ϵ , γ^G , γ^A , $\psi\beta$, δ , β - 3' (Bunn e Forget, 1986).

Os pseudogenes, representados pela letra ψ , não são funcionais, ou seja, são incapazes de codificar proteínas. Já o gene θ não possui função definida (Dacie e Lewis, 1995; Lewin, 1997). A ordem em que os genes se encontram em ambos os grupamentos é a mesma com que eles se expressam nos diferentes estágios do desenvolvimento dos indivíduos (Lewin, 1997). [Figura 5]

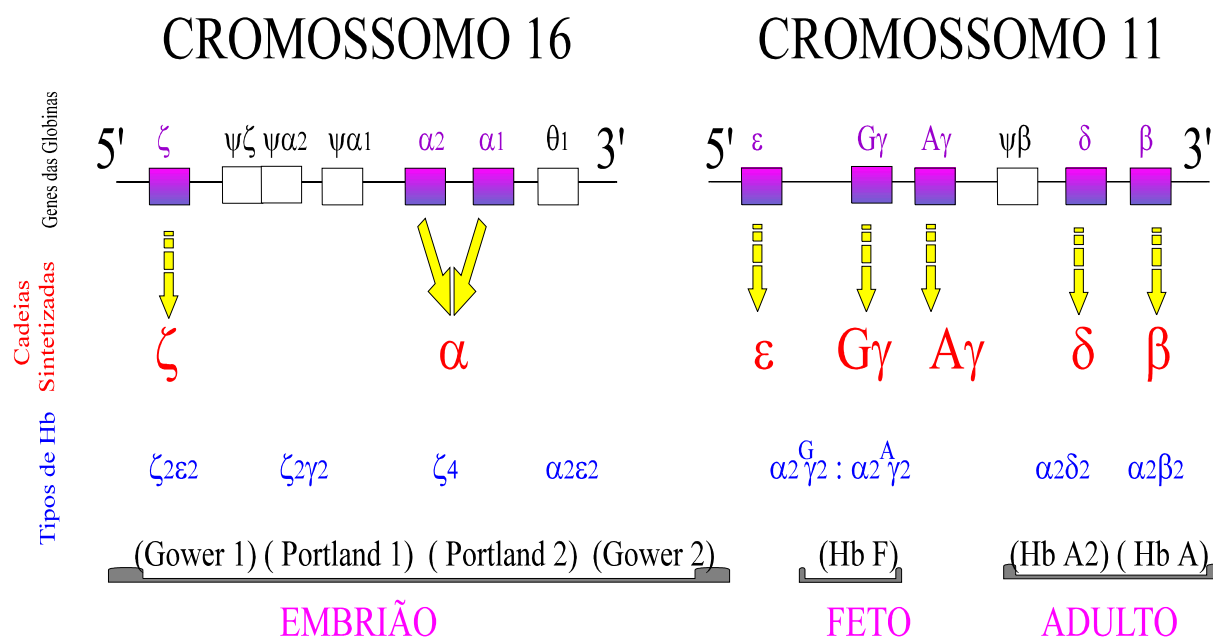


Figura 5. Representação dos grupamentos com seus genes, cadeias produzidas e Hbs formadas nos diferentes estágios de desenvolvimento.

Todos os genes de globina são compactos, ou seja, possuem cerca de 1 a 2 Kb, e compostos por três exons e dois introns (Bunn e Forget, 1986; Alberts e cols, 1997). Os genes α e γ encontram-se duplicados, sendo que os genes γ codificam cadeias diferentes ($^G\gamma$ e $^A\gamma$), dependendo se há alanina ou glicina na posição 136. Já os genes α codificam proteínas idênticas e são muito similares, apresentando apenas 17% de divergência estrutural, limitada ao intron 2 (IVS 2) e exon 3, na região 3' não-codificante [Figura 6]. Apesar de produzirem cadeias idênticas, o nível de expressão do gene α_2 é cerca de 2,5 vezes maior que o de α_1 , avaliado pela proporção de RNA mensageiro (mRNA) sintetizado. Outra particularidade dos genes alfa é a alta concentração de ligações G-C, compostas por três pontes de hidrogênio [Figura 7] (Bunn e Forget, 1986; Higgs, 1993; Lewin, 1997).

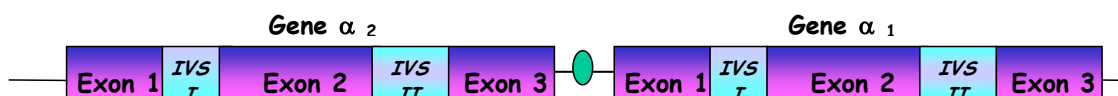


Figura 6. Representação esquemática dos genes α duplicados com seus exons e introns.

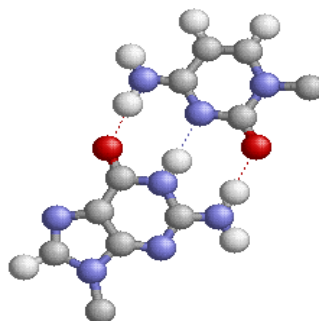


Figura 7. Representação da ligação entre moléculas de guanina e citosina, presente em alta quantidade nos genes alfa.

3. MUTAÇÕES

O termo “*mutação*”, derivado do latim “*mutare*”, significa “*troca*” ou “*mudança*” e é um termo que, ao passar dos anos, vem sofrendo modificações em seu significado.

O termo “*mutação*” possui alguns sinônimos menos usados, tais como “*variação*” e “*alteração*”, porém ele recebe maiores conotações negativas do que seus sinônimos.

O início desta contextualização negativa iniciou-se após o ano de 1956, pela associação de “*mutação*” a danos genéticos gerados pela radiação nuclear, liberada pelas bombas atômicas de Hiroshima e Nagasaki. Mais adiante, a conotação negativa foi aumentando pelas mais diversas causas, estando, popularmente, ligado à genética (Condit e cols, 2002).

Quanto ao uso científico, este termo possui definições conflitantes, pois não só ele, como também o termo “*polimorfismo*”, servem como sinônimo de “*variações genéticas*”. Estes dois termos, porém, não possuem acordo entre suas definições (Passarge, 1995).

“*Polimorfismo*” tem adquirido diversos significados ao longo da história, sendo ora considerado como diferenças nos fenótipos, ora como mudanças nas seqüências de DNA, não acompanhadas de variação fenotípica; ou, ainda, uma variação comum na seqüência de DNA entre os indivíduos, com uma freqüência entre 1% e 99% na população (Passarge, 1995).

O termo “*mutação*” também tem tido diversas definições, e não há um consenso quanto à modificação ou não de um fenótipo (Cotton e Scriver, 1998). Segundo a definição que se encontra no site do *Instituto de Pesquisa Nacional sobre o Genoma Humano* (www.nhgri.nih.gov/DIR/VIP/Glossary), “trata-se de uma alteração estrutural no DNA que, na maioria dos casos, não produz efeito, mas que, ocasionalmente, pode vir a melhorar as chances de um indivíduo sobreviver, e ainda vir a passar esta mudança benéfica a seus descendentes”. Mais adiante, o texto afirma que “se trata de uma mudança na seqüência do DNA que gera uma significativa consequência funcional, normalmente negativa, como uma doença”.

Aqui, a “*mutação*” será entendida como uma alteração na molécula de DNA que, quando atinge frequência entre 1 e 99% na população, constitui um “*polimorfismo*”, independentemente de ter ou não consequência fenotípica.

3.1. HEMOGLOBINOPATIAS

Mutações nos genes das cadeias globínicas resultam na produção de proteínas anômalas (hemoglobinopatias estruturais) ou na redução ou ausência de síntese de um ou mais tipos de cadeias globínicas (talassemias), constituindo assim as Hemoglobinopatias Hereditárias (Bunn e Forget, 1986).

As hemoglobinopatias estruturais são, geralmente, causadas por mutações de ponto, ou pequenas inserções ou deleções de bases, afetando a região codificadora do gene e causando a substituição de aminoácidos na cadeia protéica (Bunn e Forget, 1986). Como exemplo clássico, pode-se citar as Hbs S ($\alpha_2\beta_2^{6\text{-Glu}\rightarrow\text{Val}}$) e C ($\alpha_2\beta_2^{6\text{-Glu}\rightarrow\text{Lys}}$), ambas variantes de cadeias β (Dacie e Lewis, 1995).

Já as talassemias são ocasionadas pela redução ou ausência de síntese das cadeias, levando ao acúmulo daquela cadeia cuja produção está preservada. As cadeias acumuladas precipitam e acabam por lesar a membrana das hemácias, levando à destruição prematura dos eritrócitos. As talassemias mais conhecidas são as α e β , pela frequência e manifestações clínicas de considerável importância nos portadores, já que as cadeias α e β formam a hemoglobina A (Bunn e Forget, 1986; Higgs, 1993).

4. MÉTODOS UTILIZADOS NA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES GÊNICAS

As hemoglobinas anômalas podem ser detectadas através de diferentes métodos, como a eletroforese e a cromatografia. Porém, para se identificar a localização e a natureza da mutação que a originou, há necessidade de se realizar técnicas mais específicas, de análise gênica, sendo o método normalmente empregado, o sequenciamento direto de bases de DNA, que pode se manual (Sanger e cols, 1977; Maxam & Gilbert, 1977) ou automatizado (Adams e cols, 1994).

O sequenciamento manual foi desenvolvido no final da década de 70, para que fosse possível a determinação da ordem linear de bases de um fragmento de DNA. Para tal, foram utilizadas duas abordagens: a química (Maxam & Gilbert, 1977) e a enzimática (Sanger e cols, 1977), sendo esta última, o procedimento padrão utilizado atualmente.

O método enzimático é baseado na síntese de DNA *in vitro* na presença de nucleotídeos trifosfatados terminadores de cadeia. Estes nucleotídeos análogos são didesoxinucleotídeos (ddNTPs), que ao serem incorporados impedem a progressão da síntese, pois na posição 3' do carbono do açúcar existe um hidrogênio ao invés de um grupo hidroxila, o que impede a ligação fosfodiéster com o nucleotídeo seguinte. Para a determinação da sequência completa, quatro nucleotídeos trifosfatados terminadores de cadeias (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) são utilizados em separado, em reações de síntese de DNA, a partir do mesmo molde de DNA de fita simples e do mesmo oligonucleotídeo iniciador (*primer*). As bandas que se formam no gel de poliacrilamida, pela migração diferencial dos fragmentos, são identificadas através da marcação radioativa (Sanger e cols, 1977; Maxam & Gilbert, 1977). O sequenciamento manual, no entanto, é um procedimento dispendioso, demorado, que é ainda mais trabalhoso quando o gene analisado é complexo e com grande número de exons, além do emprego de isótopos radioativos.

O sequenciamento automático baseia-se no mesmo princípio que o manual, porém são utilizados fluoróforos para a marcação das bases, que serão lidas posteriormente por um seqüenciador, aparelho com fotomultiplicador que detecta a luz emitida pelos fluorocromos excitados e os registra através de um eletroferograma (Adams e cols, 1994). Este seria o método ideal para a análise de mutações devido à simplicidade, rapidez e precisão, porém a sensibilidade na detecção de uma simples mutação de ponto ainda deixa a desejar, particularmente em genes ricos em G-C, como os da globina α . Além disso, o seqüenciador é ainda um equipamento de custo elevado para grande parte dos laboratórios.

Como uma forma de se evitar o sequenciamento total dos genes, foram desenvolvidas técnicas para a triagem dos exons mutados, que uma vez detectados, seriam seletivamente sequenciados. Estas técnicas são capazes de detectar a simples substituição

de um único nucleotídeo. Entre as mais conhecidas estão o DGGE - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (Myers e cols, 1987), a Análise de Heteroduplexes, através do *Conformation Sensitive Gel Electrophoresis* (CSGE) (Ganguly e cols, 1993), e o SSCP - *Single-Strand Conformation Polymorphism* (Orita e cols, 1989).

4.1. DGGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

O DGGE foi umas das primeiras técnicas de detecção de mutações utilizadas, que teve seu uso rapidamente difundido, sendo largamente utilizado na última década para diagnósticos laboratoriais. Ela foi descrita no final dos anos 80 (Myers e cols, 1987), sendo posteriormente revisada (Fodde e Losekoot, 1994). Um fragmento de dupla fita de DNA é submetido a eletroforese em gel com crescente concentração de agentes químicos desnaturantes ou, alternativamente, com crescente aumento de temperatura. A parte do fragmento que se separa primeiro é denominada ***domínio de baixo melting***, e é geralmente constituída por seqüências ricas em A-T, ou é a porção final do fragmento. Já regiões ricas em G-C, que se separaram em temperaturas mais altas, são chamadas ***domínios de alto melting***. O ponto do gel onde a concentração do agente desnaturante (normalmente formamida e uréia) se equivale à temperatura de fusão do fragmento de DNA (T_m), será seu domínio de baixo melting, e será o ponto de início da desnaturação do mesmo, com conseqüente retardo da mobilidade eletroforética. A T_m é definida como a temperatura onde 50% das fitas duplas de DNA estarão dissociadas. Portanto, quando uma parte do fragmento começa a sofrer desnaturação, durante a eletroforese, sua mobilidade é reduzida, até que cessa completamente quando o fragmento todo é desnaturado [Figuras 8 e 9]. É importante ressaltar que as bases vizinhas à base mutada também estarão influenciando na estabilidade da dupla fita de DNA, o que também interferirá na mobilidade eletroforética.

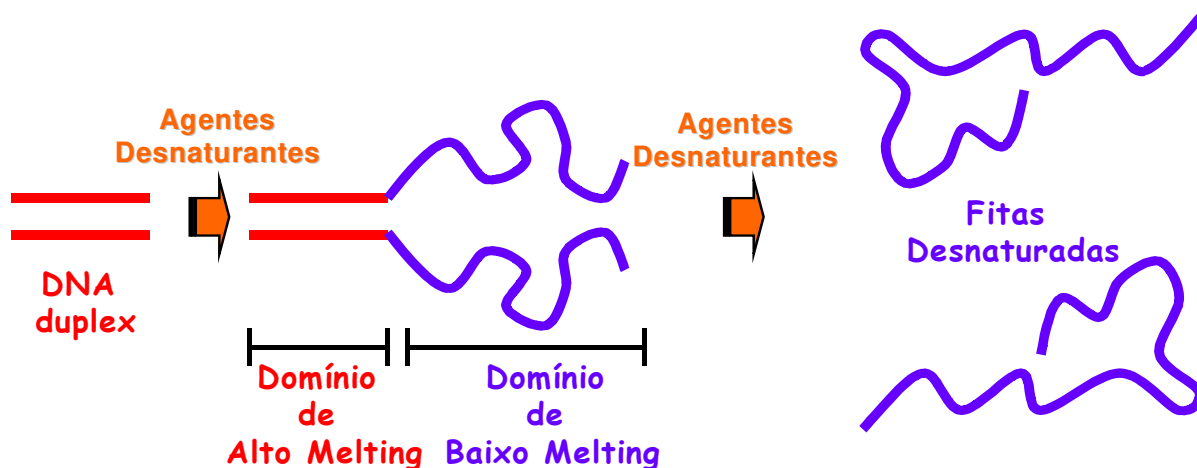


Figura 8. Separação de DNA duplex. Inicialmente o agente desnaturante separa regiões de baixa estabilidade, até que o seu aumento contínuo irá desnaturar completamente o fragmento.

Como uma forma de aumentar a sensibilidade da técnica foi introduzido o uso do chamado **grampo G-C**, que é uma seqüência de 30 a 40 pb de DNA, rica em ligações G-C, a fim de criar um falso domínio de alto *melting*, elevando a percentagem de detecção de mutações. Isto pode ser feito através da reação de PCR, onde se introduz um *primer* com o *grampo* (Myers e cols, 1987; Fodde e Losekoot, 1994).

O uso do grampo para fragmentos que já possuem altos domínios de melting, como os genes α , porém, se torna inútil, tornando o sucesso da técnica limitado às regiões que possuem domínios de baixo melting. Atualmente, apenas um grupo utiliza o DGGE na detecção de mutações nos genes da globina α , pois o equipamento disponível comercialmente não resiste às elevadas temperaturas requeridas por estes genes. O equipamento utilizado por estes pesquisadores foi manufaturado na própria Instituição de origem do grupo (Harteveld e cols, 1996).

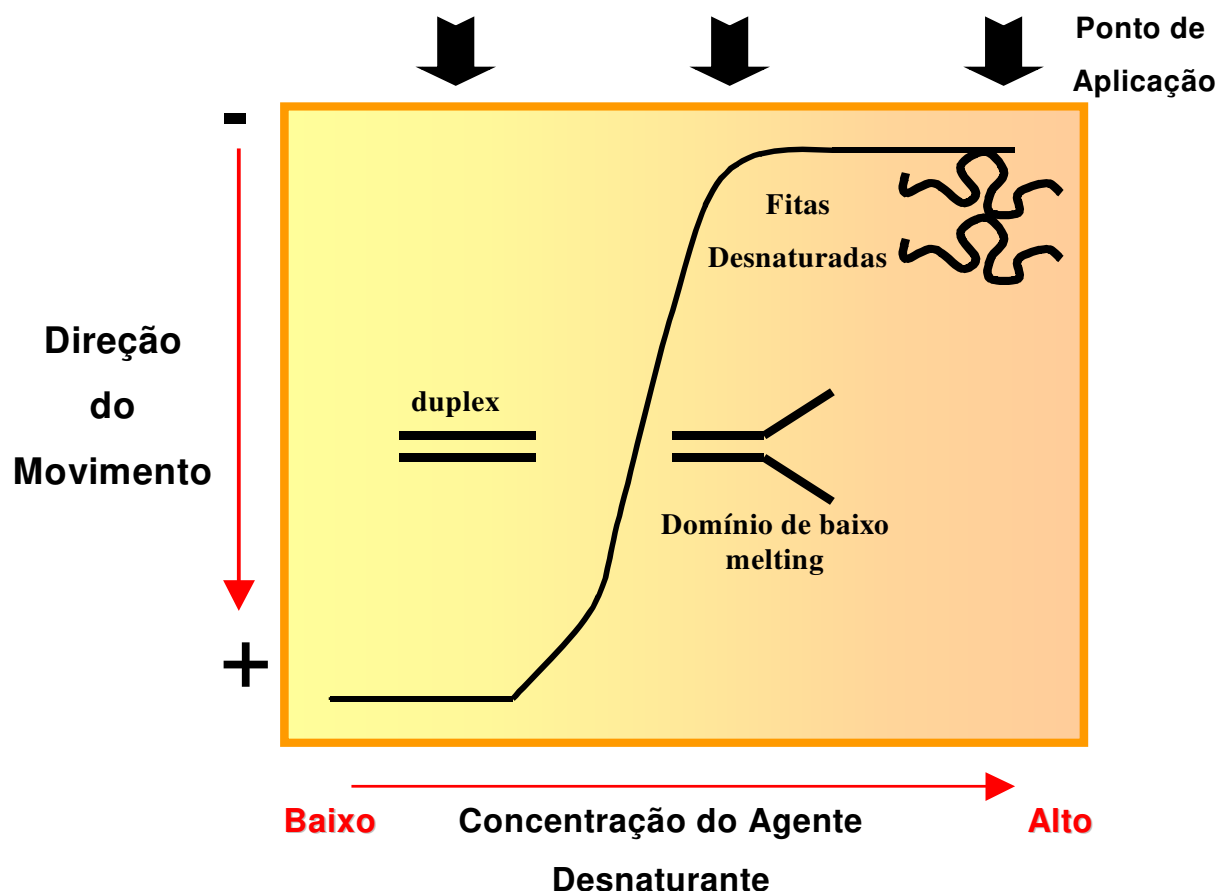


Figura 9. Efeito do agente desnaturante na mobilidade do DNA. Em altas concentrações as fitas separam-se e a mobilidade no gel é reduzida.

4.2. CSGE – Conformation Sensitive Gel Electrophoresis

Este foi mais um método desenvolvido para a detecção de não-pareamento de bases em fita dupla de DNA (*mismatch*), amplificada por PCR, e apesar de ser menos conhecido do que o SSCP, foi descrito praticamente ao mesmo tempo, tem similar simplicidade e, quando usados conjuntamente, um complementa as limitações do outro (Ganguly e cols, 1993; Ganguly e Prockop, 1995; Considine e cols, 1996; Korkko e cols, 1998; Philippe e cols, 1997).

O método foi descrito em 1993, por Ganguly e colaboradores, e é utilizado na detecção de muitas das mutações conhecidas. Ele se baseia na análise de heteroduplexes (Nagamine e cols, 1989), detectando mudanças conformacionais no fragmento de DNA, tais como a formação de “bolhas” ou “curvas” na dupla fita, nos locais de *mismatch*, que

serão responsáveis pela migração diferencial dos hetero e homoduplexes [Figura 10] (Ganguly e cols, 1993; Ganguly e Prockop, 1995; Korkko e cols, 1998). Estas mudanças conformacionais são acentuadas pela adição de solventes desnaturantes, como o etileno glicol e a formamida, em um tampão adequado (Ganguly e cols, 1993; Ganguly e Prockop, 1995; Considine e cols, 1996; Korkko e cols, 1998).

Esta técnica também utiliza um gel de poliacrilamida onde, ao invés da N',N'-metileno-bisacrilamida (Bis), normalmente escolhida, é usada a bis-acrilolpiperazina (BAP), o que melhora a resolução da separação eletroforética, além de conferir uma maior força física ao gel (Ganguly e Prockop, 1995; Ganguly, 2002).

Para que a mutação possa ser detectada, ela deve estar fora dos 50 pb iniciais ou finais do fragmento em análise, pois nessas regiões a mutação não provocaria alteração da conformação do duplex de DNA (Ganguly e cols, 1993). Apesar disso, os próprios pesquisadores que descreveram a técnica, obtiveram 100% de detecção das mutações que se localizavam nas regiões iniciais e finais do fragmento por eles estudado (Ganguly e Prockop, 1995).

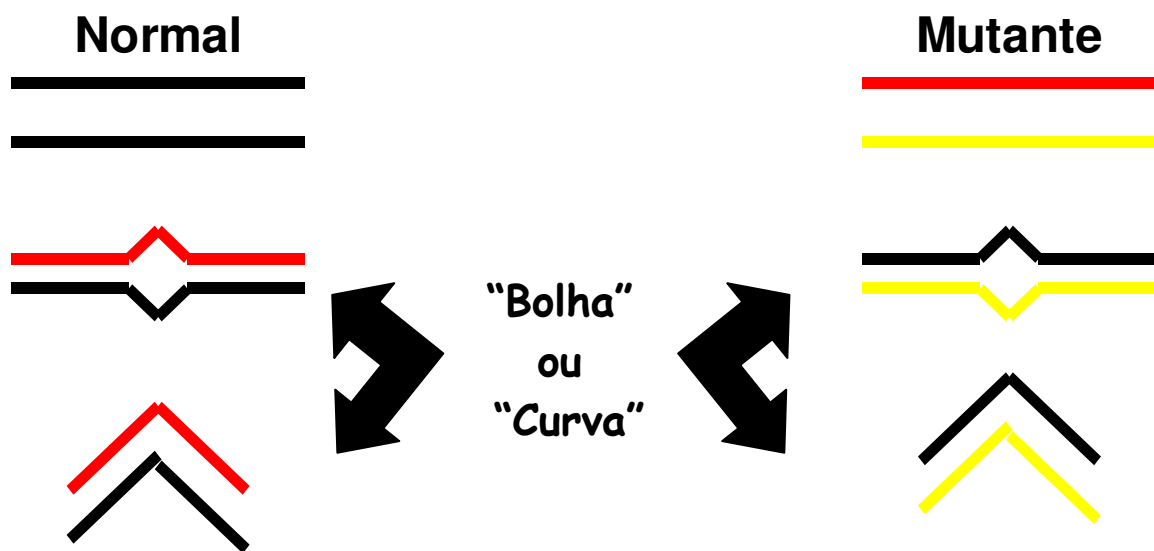


Figura 10. Representação esquemática das mudanças conformacionais geradas pela adição de agentes desnaturantes fracos na presença de *mismatches*.

4.3. SSCP - *Single Strand Conformation Polimorphism*

Descrito por Orita e col, em 1989, o SSCP tem demonstrado ser uma técnica simples e efetiva para a detecção de substituições de uma única base (Hayashi, 1992; Sheffield e cols, 1993), sendo também uma poderosa ferramenta para a triagem sistemática de mutações gênicas específicas (Ayala e cols, 1997). Como este método foi primeiramente utilizado para a análise de seqüências polimórficas (Orita e cols, 1989), ele foi nomeado de *Single Strand Conformation Polimorphism*, mas também vem sendo referido como SSCA - *Single Strand Conformation Analysis* (Davis e cols, 1994). Atualmente, o SSCP vem sendo utilizado para a detecção de mutações em genes responsáveis por várias doenças hereditárias, mutações somáticas em oncogenes ou em genes supressores de tumores, podendo também ser útil na detecção de polimorfismos ligados a genes de interesse ou mesmo servir como marcador de locus em mapa de ligação (Hayashi, 1992).

A técnica baseia-se no princípio de que moléculas de fita simples de DNA formam, sob condições não desnaturantes, diferentes estruturas secundárias que são estabilizadas por interações intra-fita. Portanto, moléculas que venham a diferir pela simples substituição de uma única base, podem formar diferentes estruturas com relação ao seu tamanho e superfície, e apresentarão diferentes migrações na eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante (Sheffield e cols, 1993; Cotton, 1997; Gibson e cols, 1997). Estas seqüências variantes, que aparecem como bandas com diferentes mobilidades eletroforéticas, são denominadas *confôrmers* [Figura 11] (Gibson e cols, 1997).

O SSCP tem sido considerado o método mais sensível para detectar variações nas seqüências em produtos de PCR de, no máximo, 200 pares de base, sendo sugerido que a detecção torna-se menos sensível quando grandes fragmentos de DNA são analisados. Também foi evidenciado que há um tamanho mínimo para que a detecção seja eficaz, o que coloca o tamanho ótimo do fragmento a ser analisado em torno de 150 pb - detecção de cerca de 97% (Sheffield e cols, 1993; Hartevelde, 1997).

Estudos mostram que a percentagem de detecção da substituição de uma única base em fragmentos de 100-300 pb chega a um valor superior a 90%, e, em fragmentos de 300-450 pb, a cerca de 75% (Hayashi, 1992; Cotton, 1997; Hartevelde, 1997). Fragmentos

com 95 pb, 115 pb, 175 pb, 212 pb, 420 pb e 600 pb corresponderam a aproximadamente 73%, 76%, 76%, 70%, 58% e 3% de detecção, respectivamente (Sheffield e cols, 1993; Harteveld, 1997). A sensibilidade do SSCP tende, portanto, a decair com o aumento do tamanho do fragmento. Para evitar este fato, seqüências longas podem ser divididas em fragmentos menores. Para isso, pode-se utilizar duas formas diferentes: amplificar-se a seqüência alvo em fragmentos menores ou amplificar-se um fragmento longo e posteriormente clivá-lo com enzimas de restrição adequadas (Hayashi, 1992; Glavac e Dean, 1993; Goodeve, 1998). Esta variação é denominada de MRF-SSCP (“múltiplos fragmentos de restrição”) (Lee e cols, 1994).

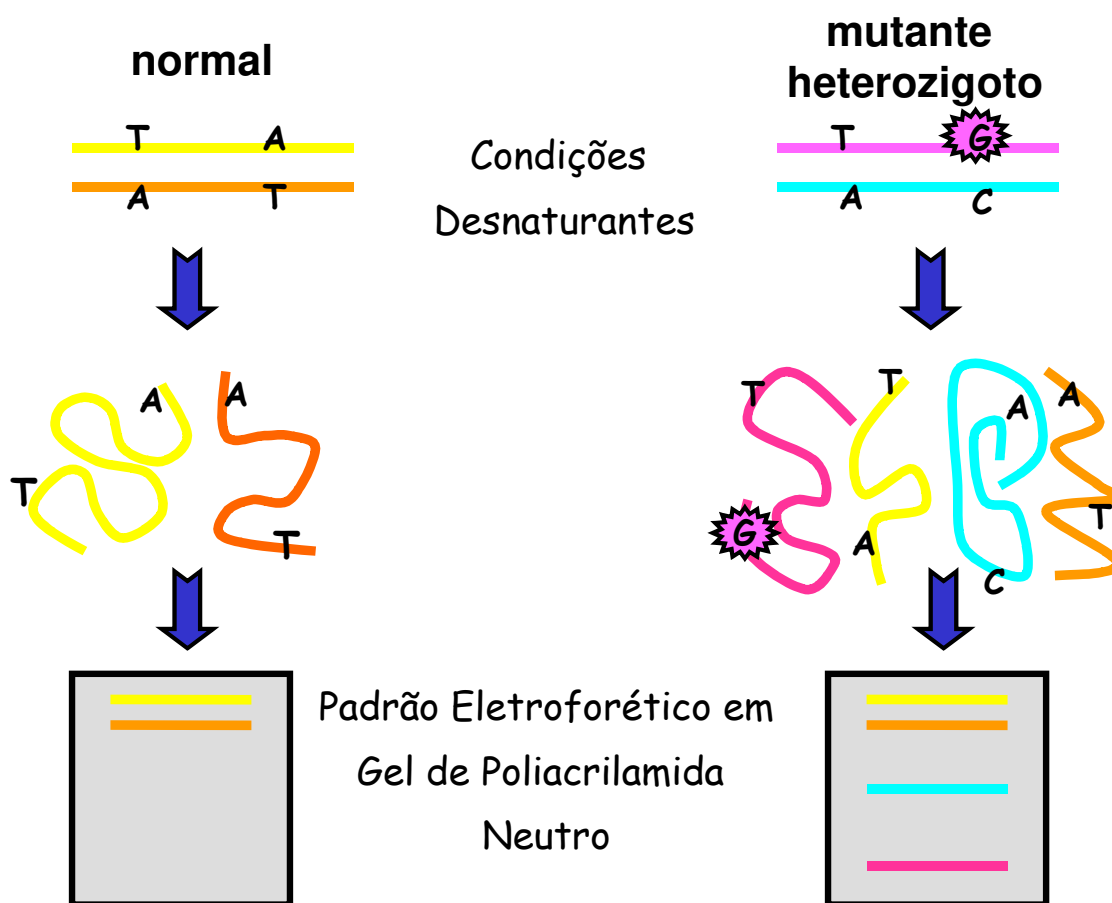


Figura 11. Representação dos vários confôrmeros formados após desnaturação da dupla fita de DNA, e a sua detecção após eletroforese em gel de poliacrilamida neutro.

O SSCP possui dois métodos de revelação: o radioativo e o não-radioativo: na primeira, mais sensível, utiliza-se isótopos radioativos, incorporados na reação de PCR (Orita e cols, 1989), enquanto que, na segunda, pode utilizar a coloração do gel pela prata (Ayala e cols, 1997; Cotton, 1997).

Ultimamente, a coloração pela prata vem tomando o lugar dos radioisótopos, devido à sua praticidade, rapidez, menor risco e boa sensibilidade, comprovada através de vários trabalhos (Hayashi, 1992; Gibson e cols, 1997; Pooart e cols, 1999).

A coloração pela prata é um método muito sensível de impregnação permanente de ácidos nucleicos em géis de poliacrilamida, e que possui cinco etapas principais: a **fixação**, onde o gel é tratado com um ácido, com o intuito de reter as macromoléculas neste suporte, não permitindo que as mesmas se difundam durante a coloração, além de retirar outras substâncias que possam interferir, tais como tampões e detergentes iônicos; a **sensibilização**, onde são utilizados reagentes que modificam as proteínas, tornando-as mais reativas à prata; a **impregnação pela prata**, onde o gel é tratado com nitrato de prata, em condições levemente ácidas, para prevenir que o íon prata seja reduzido, após o que o gel é lavado para a retirada do excesso de corante de sua superfície; a **revelação**, onde se utiliza uma solução com formaldeído que reduz o íon prata em prata metálica (reação que só ocorre em pH elevado, fornecido pelo carbonato de sódio); e a **preservação**, realizada através do glicerol, que evita rachaduras no gel após sua secagem.

Como muitas destas soluções oferecem riscos para quem as manipula, pode-se optar pelo sistema de automação do processo de coloração com o aparelho *Hoefler Automated Gel Stainer* (Pharmacia Biociences).

Neste processo, os géis de poliacrilamida são impregnados com o íon prata solúvel (Ag^+) e revelados pelo tratamento com um agente redutor. As macromoléculas no gel promovem a redução do íon prata para a prata metálica (Ag^0), que é insolúvel e, portanto, permite a visualização das bandas contendo ácidos nucleicos. A deposição inicial da prata metálica promove depósito adicional em um processo autocatalítico, o que resulta em alta sensibilidade [Figura 12].

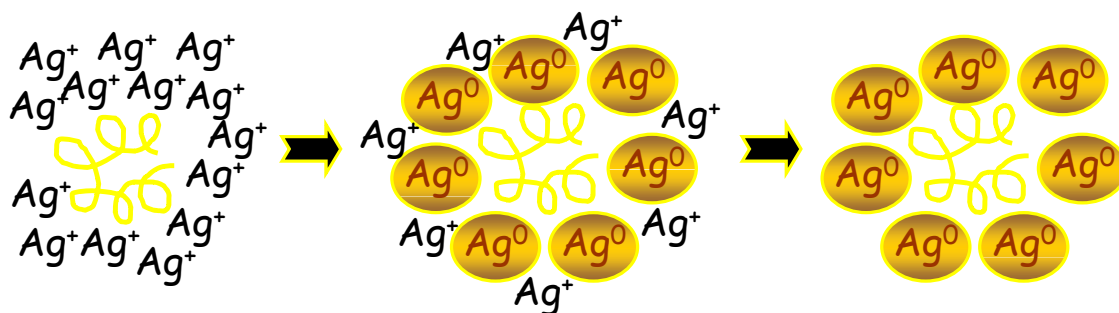


Figura 12. Representação esquemática do processo de coloração realizado com nitrato de prata. O íon prata é adicionado, em seguida reduzido, e em uma reação auto-catalítica os íons prata restantes reduzem-se à prata metálica



OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi otimizar a técnica de SSCP para análise dos genes da globina α humana, a partir de duas propostas existentes na literatura, publicadas em 1996: a de Ayala e cols., utilizando unicamente o SSCP manual e radioativo para análise de fragmentos correspondentes aos exons de ambos os genes, e a de Harteveld e cols., que analisaram fragmentos maiores, contendo tanto parte dos exons, quanto parte dos introns, empregando uma associação do SSCP com o DGGE, em equipamento artesanal construído pelos próprios pesquisadores.

A técnica normalmente utilizada para análise dos genes α é o sequenciamento completo de ambos os genes. Porém, as próprias desvantagens deste método, como o emprego de radioisótopos e o custo ainda elevado, aliadas à rica composição de ligações G-C desses genes, que provocam a necessidade de repetições até que resultados confiáveis possam ser obtidos, faz com que técnicas de triagem, como o SSCP, sejam de especial importância, particularmente para laboratórios que não dispõem de sequenciadores automáticos e queiram trabalhar com os genes α .



CAPÍTULO I

Screening for Mutations in the Human α -Globin Genes by Non-Radioactive SSCP

SB Jorge¹, MB Melo², FF Costa², MF Sonati¹

Departamento de Patologia Clínica, ²Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas - SP, Brasil.

Acknowledgements: Funding from FAPESP (grants 1997/11725-1 and 1999/11121-4) and CNPq/Brazil.

Correspondence: MF Sonati, Departamento Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas (SP), Brasil – Caixa Postal 6111 – CEP 13083-970 – Telefone: (55-19) 3788-9453 - Fax: (55-19) 3788-9434

E-mail: sonati@fcm.unicamp.br

Running title: non-radioactive SSCP for α -globin gene analysis.

Key words: α -globin genes, SSCP, α -globin structural variants, hemoglobinopathies.

Abstract

Point mutations and small insertions or deletions in the human α -globin genes may produce α -chain structural variants and α -thalassemia. Mutations can be detected either by direct DNA sequencing or by screening methods, which select the mutated exon for sequencing. Although small (around 1 Kb, 3 exons and 2 introns), the α -globin genes are duplicate (α_2 and α_1) and extremely G-C rich, what makes them difficult to denature, reducing sequencing efficiency and causing frequent artifacts. We modified some conditions of the Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) in order to optimize mutation detection in the α -globin genes.

Mutations in the human α -globin genes are not so well investigated as the β -globin gene alterations in the Brazilian population, although it has been demonstrated that they are present here, frequently in association with other hemoglobinopathies and sometimes resulting in important clinical and hematological manifestations (1-4).

Because the α -globin genes are G-C rich, artifacts in the sequencing reaction are common, what makes the use of screening mutation methods interesting, specially for those laboratories which do not have an automated sequencer available.

There are two main proposals in the literature for the screening of mutations in the α -genes: Ayala et al, 1996 (5), using the *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) technique described by Orita et al, in 1989 (6), and Hartevelde et al, 1996 (7), using an association of SSCP with DGGE - *denaturing gradient gel electrophoresis* (8). These 2 proposals, however, present some disadvantages, because the first is a radioactive SSCP and the latter combines 2 techniques and 2 different equipment, being the DGGE equipment specially manufactured for α -genes analyses.

Using the primers described by the 2 authors above mentioned, and combinations among them to produce 6 new fragments (named from A to F), we optimized the conditions for the screening of mutations in the α -genes in the PhastSystem apparatus (Amersham Biosciences), with the conventional silver staining (9). Figure 1a. shows a squematic representation of all amplified fragments and the primer pairs description. The only exception was the C_{10seq} primer, described by Hall et al, 1993 (10).

Nine structural mutations and one 5-nucleotide thalassemic deletion were tested: [Hbs Kurosaki (α 7(A5) Lys→Glu – nt22 A→G), Campinas (α 26(B7) Ala→Val – nt80 C→T), Hasharon (α 47(CE5) Asp→His – nt259 G→C), J-Rovigo (α 53(E2) Ala→Asp – nt278 C→A), Daneshgah-Tehran (α 72(EF1) His→Arg – nt335 A→G), G-Pest (α 74(EF3) Asp→Asn – nt340 G→A), Stanleyville II (α 78(EF7) Asn→Lys – nt354 C→G), Westmead (α 122(H5) His→Gln – nt628 C→G), West One (α 126(H9) Asp→Gly – nt639 A→G) e α^{HphI} (α (-5nt-IVS-I – nts 134-138-TGAGG)]. Figure 1b. shows the location of these mutations in the α -genes.

Selective amplification of the α_1 and α_2 -globin genes was carried out by PCR, according to Dodé et al, 1990 (11), and the product was used as template for a second round PCR, resulting in 24 sub-fragments (see Figure 1a). SSCP general conditions were the following: the second PCR products were mixed with denaturing solution (formamide) 1:1, heated at 95°C for 5 min, cooled on ice, and then the mixture was loaded onto a homogeneous polyacrilamide gel. Electrophoresis was performed by a pre-run at 400 V, 100Vh, 15°C, on 12.5% polyacrilamide gels, and a run at 400 V, 15°C, in PhastSystemTM apparatus (Amersham Biosciences), and a run at 600 V, 15°C, on 12.5% polyacrilamide gels, in GenePhorTM apparatus (Amersham Biosciences), both for about 3 hours. The gels were silver stained (9).

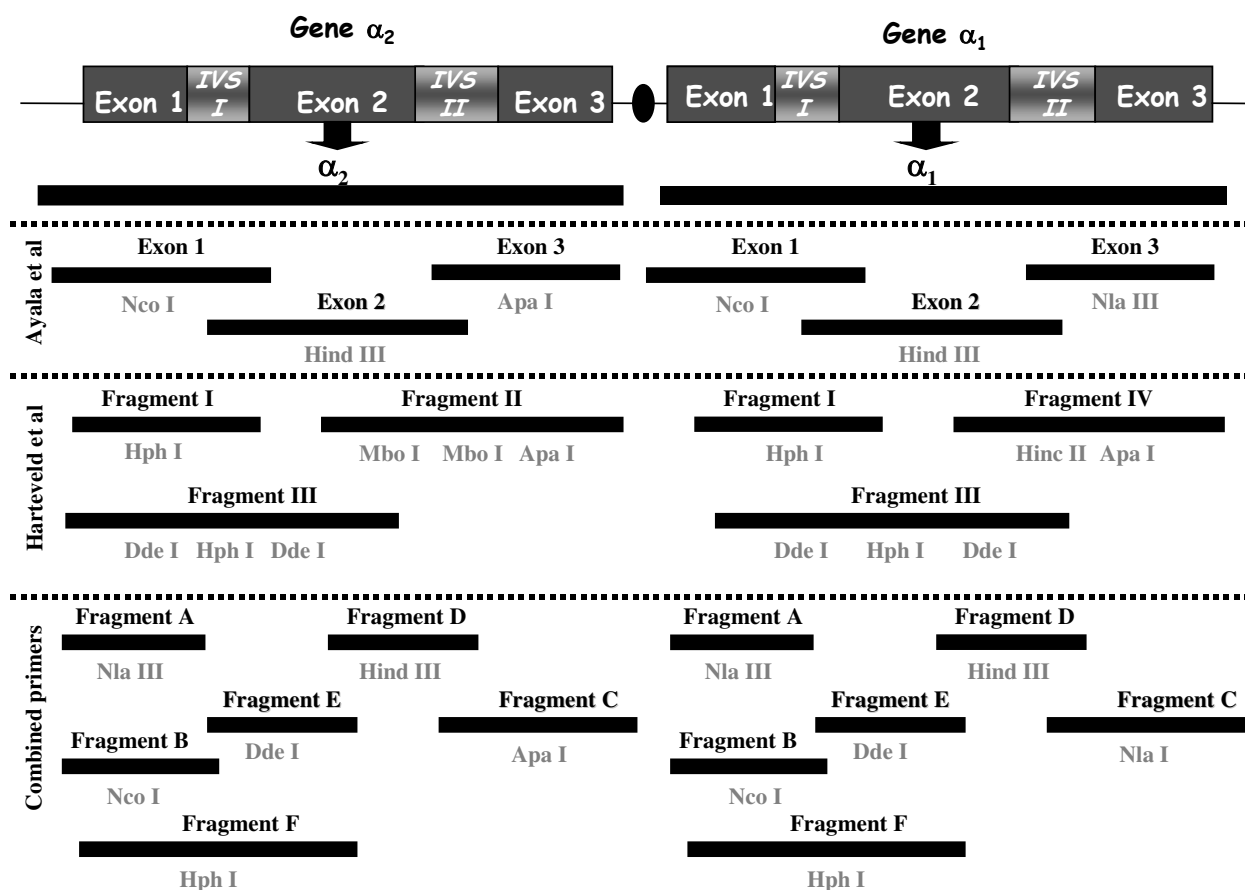
We also tried to vary these conditions using two denaturing solutions [10% LIS-“low ionic strength” (12) and formamide], a second electrophoretic apparatus (GenePhorTM), also from Amersham Biosciences, 2 gel concentrations (12.5 and 20% for PhastSystemTM and 12.5% for GenePhorTM), 3 run temperatures (4°C and 15°C for PhastSystemTM, and 5°C and 15°C for GenePhorTM), and entire and shortened fragments (cut with restriction enzymes). The fragments and conditions which showed the best quality of electrophoretic separation and 100% of mutation detection are demonstrated in Table 1. No difference was observed between LIS and formamide denaturing solutions. PhastSystem apparatus was a better choice, perhaps because it allows the use of 20% gel concentration, where the best electrophoretic performance was obtained. Reducing fragment length, in this case, did not help to improve the sensitivity of mutation detection.

Basis composition of the fragments rather than their sizes was the most influent parameter checked and it is dependent on the primer pair choice, once each fragment produces one main stable conformation which is determined by the intramolecular interactions of their primary sequence (13).

Therefore, with the modifications included here, SSCP provided a sensitive and efficient method for the screening of mutations in the α -globin genes. This strategy may be important for laboratories that wish to work on these genes and do not have an automated sequencer; it will speed up the procedures, will reduce costs originated by frequent sequencing repetitions, and will increase the reliability of results.

Table 1. SSCP Best Primer Combinations and Conditions.

Fragments	Primer Pairs	PCR – annealing T°	PhastGel Concentration	PhastSystem Time (vhs)	Run Temperature	% Detection
A	D65 + S12	58°	20 %	600	15°	100 %
C	D71 + S6	61°	20 %	890	15°	100 %
D	S3 + C72	61°	20 %	400	15°	100 %
E	D68 + S18	61°	20 %	400	15°	100 %



exon 1= D65+C69 (5'- ACT- CCC- CTg- Cgg- TCC- gg -3' + 5'- gAA- ggA- CAg- gAA- CAT- CCT -3')
 exon 2= D68+C72 (5'- ACA- ggC- CAC- CCT- CAA- CCg- T -3' + 5'- CAg- gCC- CgC- AgC- CgC- CgC- CT -3')
 exon 3(α_1)= D71+C113 (5'- AgA- ggA- TCA- CgC- ggg- TTg- C -3' + 5'- AAA- ACT- CAg- gCA- CAC- ACA- gg -3')
 exon 3(α_2)= D71+C110; (5'- AgA- ggA- TCA- CgC- ggg- TTg- C -3' + 5'- ATT- CCg- ggA- CAg- AgA- gAA- CC -3')
 fragment I=S1+S12 (5'- CAC- AgA- CTC- AgA- gAg- AAC- C -3' + 5'- ggA- Agg- ACA- ggA- ACA- TCC- Tg -3')
 fragment II= S3+S6 (5'- ggC- Aag- Aag- gTg- gCC- gAC -3' + 5'- TCC- ATT- gTT- ggC- ACA- TTC- C -3')
 fragment III= S7+S18 (5'- Tgg- Agg- gTg- gAg- ACg- TCC- Tg -3' + 5'- CgT- Tgg- gCA- TgT- CgT- CCA- C -3')
 fragment IV= S3+S8 (5'- ggC- Aag- Aag- gTg- gCC- gAC -3' + 5'- CTg- gCA- CgT- TTC- TgA- ggg- AA -3')
 fragment A= D65+S12 (5'- ACT- CCC- CTg- Cgg- TCC- gg -3' + 5'- ggA- Agg- ACA- ggA- ACA- TCC- Tg -3')
 fragment B= D65+C10seq (5'- ACT- CCC- CTg- Cgg- TCC- gg -3' + 5'- ACg- gTT- gAg- ggT- ggC- CTg- T -3')
 fragment C (α_1) = D71+S8 (5'- AgA- ggA- TCA- CgC- ggg- TTg- C -3' + 5'- CTg- gCA- CgT- TTC- TgA- ggg- AA -3')
 fragment C (α_2) = D71+S6 (5'- AgA- ggA- TCA- CgC- ggg- TTg- C -3' + 5'- TCC- ATT- gTT- ggC- ACA- TTC- C -3')
 fragment D= S3+C72 (5'- ggC- Aag- Aag- gTg- gCC- gAC -3' + 5'- CAg- gCC- CgC- AgC- CgC- CT -3')
 fragment E = D68+S18 (5'- ACA- ggC- CAC- CCT- CAA- CCg- T -3' + 5'- CgT- Tgg- gCA- TgT- CgT- CCA- C -3')
 fragment F= S1+S18 (5'- CAC- AgA- CTC- AgA- gAg- AAC- C -3' + 5'- CgT- Tgg- gCA- TgT- CgT- CCA- C -3')

Figure 1a. Schematic representation of fragments and primers origin.

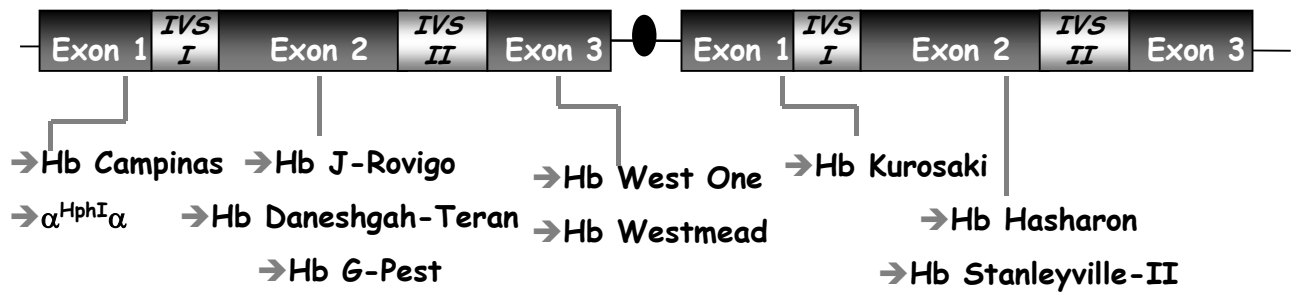


Figure 1b. Schematic representation of the α -globin gene mutations tested by SSCP.

References

1. **Zago MA, Costa FF** (1985). Hereditary haemoglobin disorders in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **79**: 385-388.
2. **Costa FF, Figueredo MS, Sonati MF, Kimura EM, Martins CS** (1992). The IVS-I-110 (G-->T) and codon 39 (C-->T) beta-thalassemia mutations in association with alpha-thal-2 (-alpha3.7 Kb) and Hb Hasharon [alpha 47(CE5)Asp-->His] in a Brazilian patient. *Hemoglobin*, **16**:525-528.
3. **Sonati MF, Kimura EM, Grotto HZW, Gervásio SA, Costa FF** (1996). Hereditary hemoglobinopathies in a population from southeast Brazil. *Hemoglobin*, **20**: 175-179.
4. **Wenning MRSC, Kimura EM, Costa FF, Saad STO, Gervásio S, Jorge SB, Borges E, Silva NM, Sonati MF** (2000). α -Globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **33**: 1041-1045.
5. **Ayala S, Colomer D, Pujades A, Aymerich M, Vives Corrons JLL** (1996). Haemoglobin Lleida: a new α_2 -globin variant (12 bp deletion) with mild thalassaemic phenotype. *British Journal of Haematology*, **94** ; 639 – 644.
6. **Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T** (1989). Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **86** : 2766 – 2770.

7. **Harteveld CL, Heister JGAM, Giordano PC, Losekoot T, Bernini LF** (1996). Rapid detection of point mutations and polymorphisms of the α -globin genes by DGGE and SSCA. *Human Mutation*, **7**: 114 - 122.
8. **Myers RM, Maniatis T, Lerman LS** (1987). Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*, **155**: 501-527.
9. **Gibson J, Glass T, Einhorn P** (1997). Analysis of frequently mutated regions of BRCA 1 by SSCP using PhastGel[®] analysis and silver staining. *Science Tools from Pharmacia Biotech*, **2**: 3.
10. **Hall GW, Thein SL, Newland AC, Chisholm M, Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Katamis C, Higgs DR** (1993). A base substitution (T→C) in codon 29 of the alpha 2-globin gene causes alpha thalassaemia. *British Journal of Haematology.*, **85** (3): 546-52.
11. **Dodé C, Rochette J, Krishnamoorthy R** (1990). Locus assignment of human α -globin mutations by selective amplification and direct sequencing. *British Journal of Haematology*, **76** : 275 – 281.
12. **Maruya E, Saji H, Yokoyama S** (1996). PCR-LIS-SSCP (Low ionic strength single-strand conformation polymorphism) – A simple method for high-resolution allele typing of HLA-DRB1, -DPB1. *Genome Research*, **6**: 51-7.
13. **Hayashi K, Yandell DW** (1993). How sensitive Is PCR-SSCP?. *Human Mutation*, **2**: 338-346.



DISCUSSÃO

A utilização de métodos de triagem na detecção de mutações foi um grande avanço para o diagnóstico molecular de muitas alterações genéticas. A triagem tornou possível a detecção de mutações em genes com grande número de exons, com maior rapidez e confiabilidade (Cotton, 1997), viabilizando a laboratórios que não dispõem de sequenciadores automáticos, a investigação de mutações relacionadas a doenças genéticas comuns. Dessa forma, faz-se necessária uma boa padronização e adaptação da técnica às condições locais e às características do gene de interesse, para que a mesma seja útil e possa dar segurança ao diagnóstico (Cotton, 1997).

Dentre os vários métodos descritos na literatura, o SSCP é aquele que vem apresentando melhores resultados, tanto pela rapidez e simplicidade, quanto pela sensibilidade e reprodutividade (Hayashi, 1992; Glavac e Dean, 1993).

Como os genes α , apesar de pequenos, são duplicados e ricos em G-C, foi objetivo do presente trabalho otimizar a triagem de mutações nestes genes utilizando o SSCP a partir de duas propostas pré-existentes na literatura (Ayala e cols, 1996; Hartevelde e cols, 1996).

Empregando o sistema de eletroforese PhastSystem[®] (Pharmacia Biosciences), com coloração pela prata, 4 fragmentos (A, C, D e E ou B, C, D e E), de 204 a 378 pb, obtidos pela combinação dos *primers* descritos em ambos os trabalhos, concentração de poliacrilamida de 20%, temperatura de corrida eletroforética de 15°C, e tempos de corrida variáveis, adequados à análise de cada fragmento, foram obtidos 100% de detecção entre as 10 mutações testadas.

O fato do PhastSystem[®] ter gerado resultados melhores do que os obtidos pelo sistema GenePhor[®] não era um resultado esperado, já que géis de dimensões maiores possuem uma sensibilidade maior na detecção de bandas (Hayashi, 1992). Esse resultado talvez possa ser explicado pela menor concentração de poliacrilamida do GeneGel[®] (12,5%), comparada à concentração de 20% do PhastGel[®] (Savov e cols, 1992).

Quanto às soluções desnaturantes formamida ou LIS 10%, não foram observadas diferenças significativas na sensibilidade de detecção.

Diferentemente do esperado, os fragmentos maiores, com cerca de 500-600 pb, não foram melhor detectados após digestão com enzimas de restrição, provavelmente devido à conformação adquirida pelos novos fragmentos gerados, que não puderam ser adequadamente separados na eletroforese.

A variação da temperatura de 4°C para 15°C não interferiu na separação das bandas formadas no gel após a eletroforese.

O que provavelmente mais influenciou a capacidade de detecção da técnica foi a ordem sequencial e a composição de bases dos fragmentos formados, já que a diminuição dos fragmentos II e III, através da digestão, continuou não permitindo a detecção de algumas mutações; da mesma forma, tivemos fragmentos (exon 2 e fragmento II) nos quais algumas mutações puderam ser detectadas e outras não. Assim, a variação nas bases vizinhas às mutações, através das diferentes combinações de primers, constituiu importante estratégia que resultou no alto grau de sensibilidade apresentado pelo SSCP. Apesar de alguns fragmentos mutantes não diferirem dos controles normais em uma ou outra condição de triagem, todas as mutações testadas acabaram por ser detectadas. A habilidade para detectar mutações depende de como a mutação afeta a estrutura secundária da molécula de DNA, e como isso interfere na mobilidade eletroforética da sequência amplificada. Por isso, a escolha adequada dos primers que flanquearão a região a ser analisada é de grande importância para formação de confôrmeros que venham a ter uma mobilidade eletroforética diferente do seu controle normal.

A utilização, com sucesso, de uma técnica de triagem como o SSCP fornece uma análise simples, sensível e com menores riscos para quem a manipula, além de permitir que uma gama de laboratórios que ainda não dispõem de recursos como o sequenciador automático possam cada vez mais realizar diagnósticos clínicos.

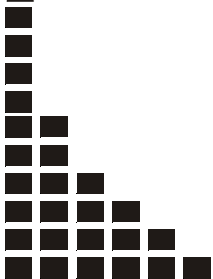


CONCLUSÃO

Foram aqui apresentadas as condições padronizadas para triagem de mutações nos genes da globina α por SSCP em sistema eletroforético PhastSystem[®], condições estas que permitiram 100% de detecção entre 10 mutações testadas, sendo 9 responsáveis por alterações estruturais na molécula de Hb e 1 pela perda de expressão do gene α_2 .

Com a combinação dos primers descritos por Ayala e cols e Harteveld e cols, em 1996, foram obtidos seis novos fragmentos: A, B, C, D, E e F; destes, 4 (A, C, D e E ou B, C, D e E) permitiram, sem o auxílio de enzimas de restrição, a detecção de todas as mutações.

O SSCP em sistema PhastSystem[®] provou ser um método sensível e eficiente para a triagem de mutações nos genes α , sobrepondo-se a outros métodos que são demorados e utilizam isótopos radioativos; contudo, a estratégia de escolha dos pares de *primers* torna-se fundamental para o sucesso da técnica, especialmente tratando-se de mutações em regiões ricas em ligações G-C. A eficácia desta técnica é de grande relevância, pois a detecção de mutações em genes responsáveis por doenças hereditárias está se tornando um importante instrumento em testes clínicos e pode ser realizada mesmo em laboratórios que não possuam sequenciadores automáticos.



***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

Adams MD, Fields C, Venter JC. (1994) - *Automated DNA sequencing and analysis*. Academic Press Limited, London, 368 pp.

Alberts B, Watson JD, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K. (1997) - *Biologia Molecular da Célula*. 3ª edição.

Ayala S, Colomer D, Pujades A, Aymerich M, Vives Corrons JLL. (1996) - Haemoglobin Lleida: a new α_2 -globin variant (12 bp deletion) with mild thalassaemic phenotype. *British Journal of Haematology*, **94**; 639 – 644.

Ayala S, Colomer D, Aymerich, M, Abella, E, Vives Corrons, JLL. (1997) - First description of frameshift mutation in the α_1 -globin gene associated with α -thalassemia. *British Journal of Haematology*, **98**: 47 – 50.

Bunn HF, Forget BG (1986) - Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. 1st edition. Philadelphia, London, Toronto, Mexico City, Rio de Janeiro, Sydney, Tokyo, Hong Kong, W.B. Saunders Company.

Considine, RV, Considine EL, Williams CJ, Nyce MR, Zhang P, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Bauer TL, Moore JH, Caro JF. (1996) – Mutation screening and identification of a sequence variation in the human OB gene coding region. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **220**: 735 – 739.

Condit CM, Achter PJ, Lauer I, Sefcovic E. (2002) – The changing meanings of “mutation”: A contextualized study of public discourse. *Human Mutation*, **19**: 69-75.

Cotton RGH (1997) – Mutation detection. 1st edn. Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press.

Cotton RGH, Scriver CR. (1998) – Proof of “disease causing” mutation. *Human Mutation*, **12**: 1-3.

Davis LG, Kuehl WM, Battey JF. (1994) - *Basic Methods in Molecular Biology*. 2nd edition. London, Sydney, Toronto, Mexico, New Delhi, Tokyo, Singapore, Rio de Janeiro, New Jersey.

Dacie JV, Lewis SM. (1995) - Practical Haematology. 8th edition. Churchill, Livingstone, Hong Kong, London, Madrid, Melbourne, New York and Tokyo.

Fodde R, Losekoot M. (1994) – Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Human Mutation*, **3**: 83-94.

Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ (1993) - Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-strand PCR products and DNA fragments. Evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **90** (21): 10325 – 10329.

Ganguly A, Prockop DJ. (1995) – Detection of mismatched bases in double strand DNA by gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **16**: 1830-35.

Ganguly A. (2002) – An update on conformation sensitive gel electrophoresis. *Human Mutation*, **19**: 334-342.

Gibson J, Glass T, Einhorn P. (1997) – Analysis of frequently mutated regions of BRCA 1 by SSCP using PhastGel™ analysis and silver staining. *Science Tools from Pharmacia Biotech*, **2**, 3.

Glavac D, Dean M. (1993) – Optimization of single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Human Mutation*, **2**: 404-14.

Goodeve AC. (1998) – Laboratory methods for the genetic diagnosis of bleeding disorders. *Clinical and Laboratory Haematology*, **20**: 3-19.

Harteveld CL, Heister JGAM, Giordano PC, Losekoot T, Bernini LF (1996) - Rapid detection of point mutations and polymorphisms of the α -globin genes by DGGE and SSCA. *Human Mutation*, **7**: 114 - 122.

Harteveld CL (1997) – The Molecular Genetics of α -Thalassemia. Structure and Expression of the α -globin gene cluster. Rijksuniversiteit te Leiden. PhD Thesis.

Hayashi K. (1992) – PCR-SSCP: A method for detection of mutations. *Gata*, **9** (3): 73-79.

International Hemoglobin Information Center Variant List (1997). *Hemoglobin*, **21** (6): 505 - 622.

Higgs DR. (1993) - α -Thalassaemia. *Bailliere's Clinical Haematology*, **6** (1): 117-150.

Körkko J, Annunen S, Pihlajamaa T, Prockop D, Körkko LA (1998 a) - Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutation: Comparison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **95** (4): 1681 -1685.

Körkko J, Milunsky J, Prockop D, Körkko LA (1998) – Use of conformation sensitive gel electrophoresis to detect single base changes in the gene for COL10A1. *Human Mutation*, supp.1: S201 – S203.

Lee HH, Chang JG, Chen RT, Yang ML, Choo KB. (1994) – Prenatal diagnosis of β -thalassemic mutations in Chinese by multiple restriction fragment-single strand conformation polymorphism analysis. *Proceedings of the National Science, Council*, **18**(3):112-17.

Lewin B. (1997) – Genes VI. 1st edition. Oxford, New York and Tokyo.

Maxam AM, Gilbert W. (1977) – A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **74**: 560 – 564.

Myers RM, Maniatis T, Lerman LS (1987) - Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*, **155**: 501 -527.

Nagamine CM, Chan K, Lau YF. (1989) – A PCR artifact: generation of heteroduplexes. *American Journal of Human Genetics*, **45** (2): 337 – 339.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. (1989) - Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **86**: 2766 – 2770.

Passarge, E. (1995) – *Color Atlas of Genetics*. George Thieme Verlag Stuttgart. New York. pp156.

Philippe C, Porter DE, Emerton ME, Wells DE, Simpson AHRW, Monaco AP. (1997) - Mutation screening of the EXT₁ and EXT₂ genes in patients with hereditary multiple exostoses. *American Journal of Human Genetics*, **61**: 520 - 528.

Pooart J, Limpai boon T, Lulitanond V. (1999) – Improved nonisotopic PCR-SSCP for screening of p53 mutations. *Clinical Biochemistry*, **32** (3): 233-35.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) – DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **74**: 5463 – 5467.

Savov A, Angelicheva D, Jordanova A, Eigel A, Kalaydjieva L. (1992) - High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucleic Acids Research*, **20** (24): 6741-6742.

Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone ED. (1993) - The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection pf single base substitutions. *Genomics*, **16**: 325 -332.

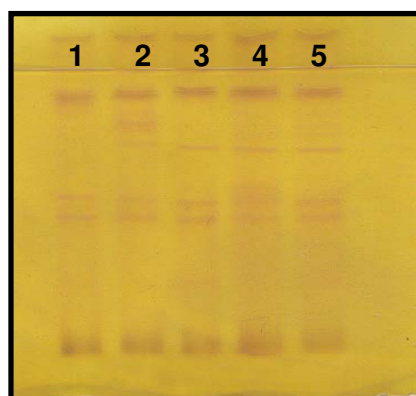


ANEXOS

Figura 1 -Técnica de SSCP na análise de mutações nos exons 1, 2 e 3 (Ayala e col, 1996) no PhastGel[®] Homogeneo 20, com a utilização de tiras de tampão PhastGel Native[®], no sistema de eletroforese PhastSystem[®].

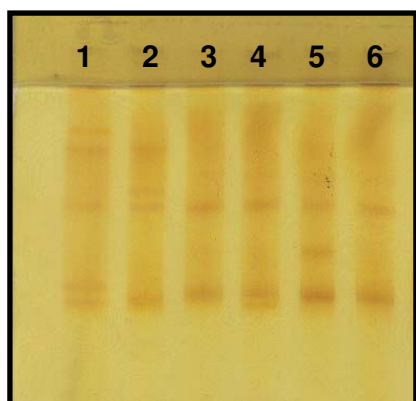
As condições foram 400V a 15°C. Pode-se notar que houve 100% de sensibilidade na detecção das mutações nos exons 1 e 3 (**A** e **C**) e 80% de sensibilidade na detecção de mutações no exon 2 (**B**).

Figura A
Exon 1



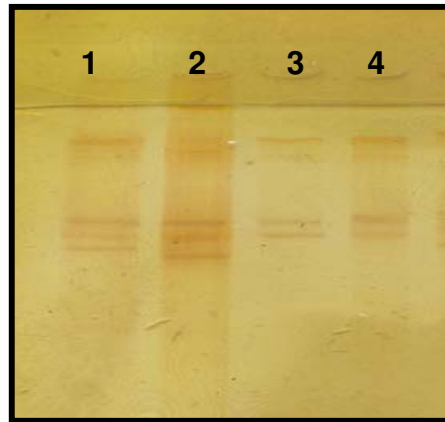
- 1 – Hb Kurosaki
- 2 – Hb Campinas
- 3 – $\alpha^{\text{Hph I}}\alpha/\alpha\alpha$
- 4 – $\alpha^{\text{Hph I}}$
- 5 – Controle Normal

Figura B
Exon 2



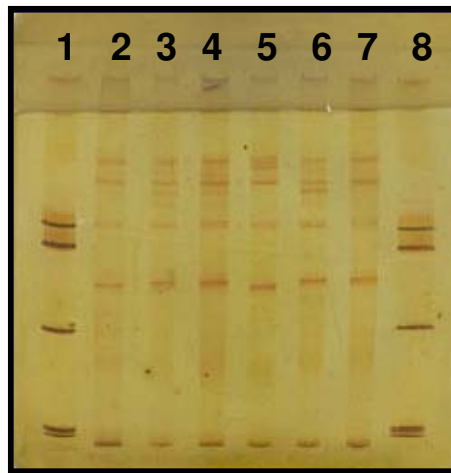
- 1 – Hb Hasharon
- 2 – Hb Stanleyville II
- 3 – Hb J-Rovigo
- 4 – Hb G-Pest
- 5 – Hb Daneshgah-Tehran
- 6 - Controle Normal

Figura C
Exon 3



- 1 – Hb Westmead
- 2 – Hb West One
- 3 – Controle Normal
- 4 – Controle Normal

Figura D
Exon 2 digerido com Hind III

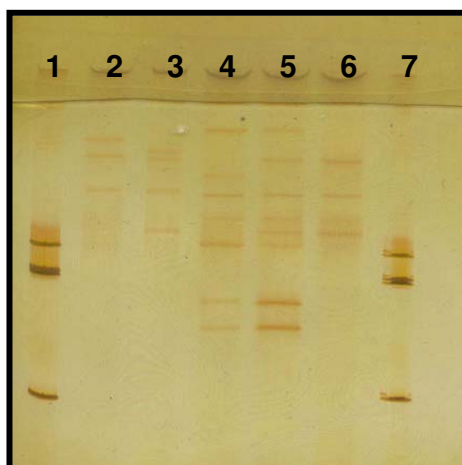


- 1 – Marker Hae III ϕ X
- 2 – Hb Stanleyville II
- 3 – Hb J-Rovigo
- 4 – Hb G-Pest
- 5 – Hb Hasharon
- 6 – Daneshgah-Tehran
- 7 – Controle Normal
- 8 – Marker Hae III ϕ X

Figura 2 - Técnica de SSCP na análise de mutações nos fragmentos I, II, III e IV (Harteveld e col, 1996) no PhastGel® Homogeneo 12.5 e 20, com a utilização de tiras de tampão PhastGel Native®, no sistema de eletroforese PhastSystem®.

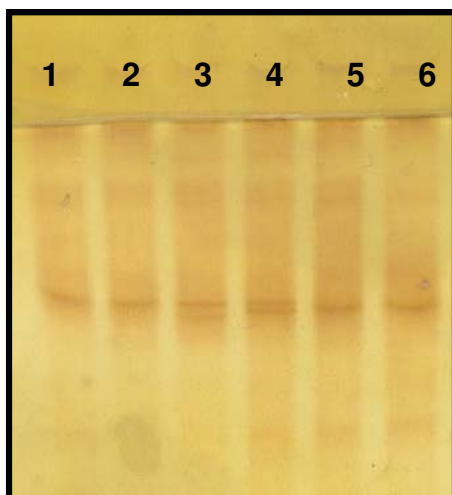
As condições foram utilizadas : 400V a 15°C. A detecção das mutações no fragmento I (A) obteve 100% de sensibilidade com a utilização do gel a 20%, e no fragmento II (B) só se obteve 50%. Já as mutações nos fragmentos III e IV não puderam ser detectados por esta técnica, nas condições utilizadas por nós.

Figura A
Fragmento I



- 1 – Marker Hae III ϕ X
- 2 – Hb Kurosaki
- 3 – Hb Campinas
- 4 – $\alpha^{\text{HphI}} \alpha / \alpha \alpha$
- 5 – $-- / \alpha^{\text{HphI}}$
- 6 – Controle Normal
- 7 – Marker Hae III ϕ X

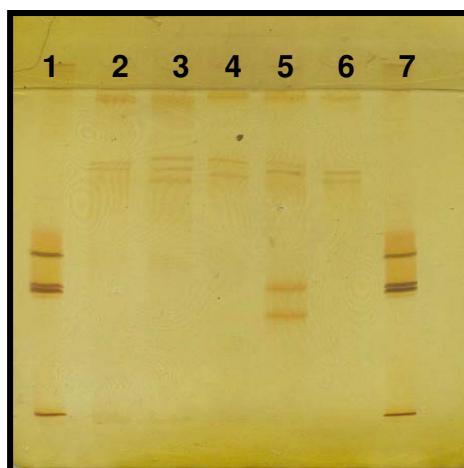
Figura B
Fragmento II



- 1 – Hb G-Pest
- 2 – Hb Daneshgah-Tehran
- 3 – Hb Westmead
- 4 – Hb West One
- 5 – Controle Normal
- 6 - Controle Normal

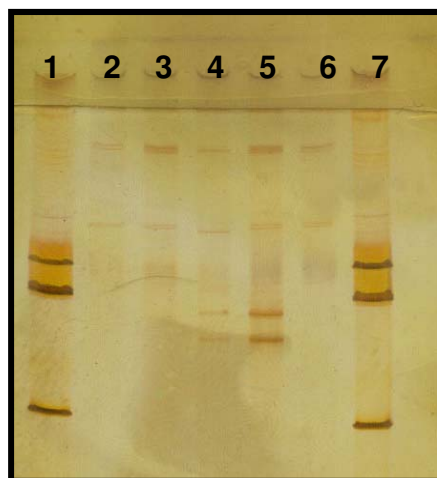
Figura 3 – Análise das mutações presentes nos fragmentos A, B, C, D, E e F pela Técnica de SSCP utilizando PhastGel® Homogeneo 20, com condições já descritas e visualização das bandas pela coloração com a prata. Todos estes fragmentos tiveram suas mutações detectadas, dando ao SSCP 100% de sensibilidade.

Figura A
Fragmento A



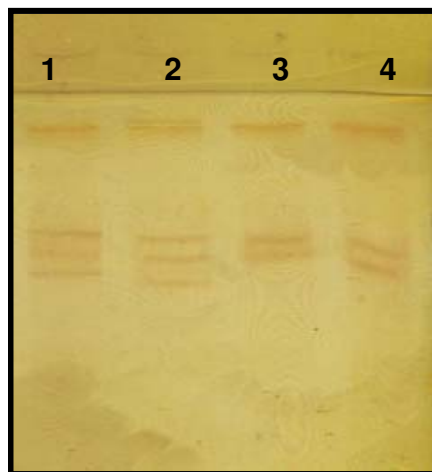
- 1 – marker Hae III ϕ X;
- 2 – Hb Campinas;
- 3 – Hb Kurosaki;
- 4 – $--/\alpha^{\text{Hph I}}$
- 5 – $\alpha^{\text{Hph I}}\alpha/\alpha\alpha$
- 6 – Controle Normal;
- 7 – marker Hae III ϕ X.

Figura B
Fragmento B



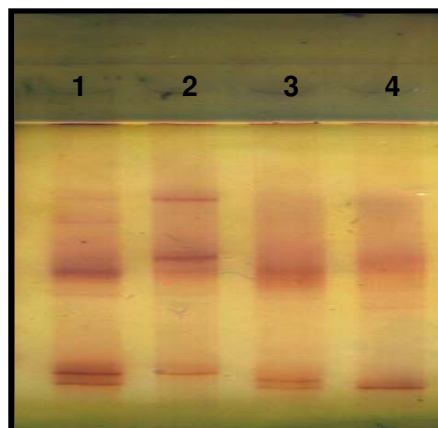
- 1 – marker Hae III ϕ X.
- 2 – Hb Kurosaki;
- 3 – Hb Campinas;
- 4 – $--/\alpha^{\text{Hph I}}$;
- 5 – $\alpha^{\text{Hph I}}\alpha/\alpha\alpha\alpha$
- 6 – Controle Normal;
- 7 – marker Hae III ϕ X.

Figura C
Fragmento C



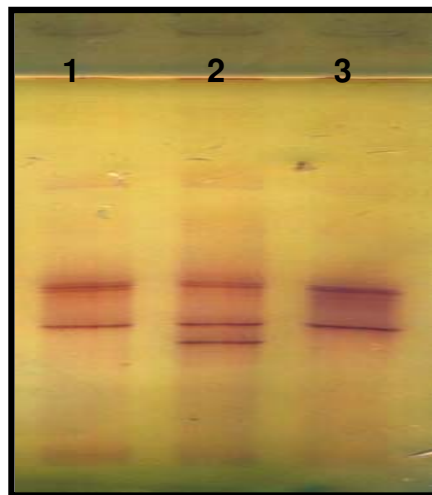
- 1 – Hb West One
- 2 – Hb Westmead
- 3 – Controle Normal
- 4 – Controle Normal

Figura D
Fragmento D



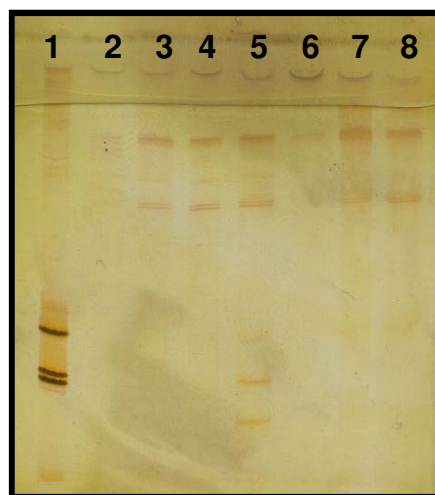
- 1 – Hb G-Pest
- 2 – Hb Daneshgah-Tehran
- 3 – Hb Stanleyville II
- 4 – Controle Normal

Figura E
Fragmento E



- 1 – Hb J-Rovigo
- 2 – Hb Hasharon
- 3 – Controle Normal

Figura F
Fragmento F



- 1 – marker Hae III ϕ X;
- 2 – Hb Kurosaki;
- 3 – Hb Campinas;
- 4 – $--/\alpha^{\text{Hph I}}$
- 5 – $\alpha^{\text{Hph I}}\alpha/\alpha\alpha$
- 6 – Hb Hasharon
- 7 – Hb J-Rovigo
- 8 - Controle Normal

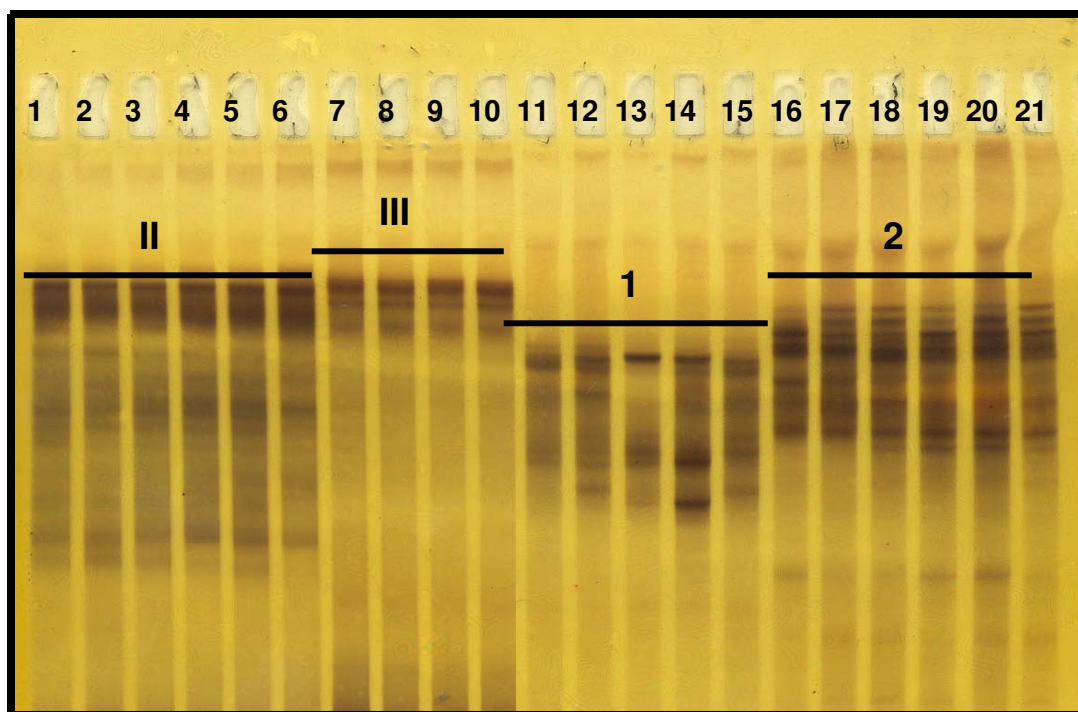
Figura 4 – Análise das mutações através da Técnica de SSCP utilizando GeneGel 12.5 em sistema de eletroforese GenePhor: **(A)** Os fragmentos A, B, D, E e F geraram bons resultados. **(B)** Porém, nos exons 1, 2 e fragmentos II e III, não tiveram bons resultados. Apenas as mutações do exon 1 puderam ser identificadas, e as mutações no exon 2 obtiveram apenas 40% de sensibilidade.

Figura A
Fragmentos A, B, C, D, E e F



Fragmento A	Fragmento B	Fragmento D	Fragmento E
1 – Hb Campinas	6 – Hb Campinas	11 – Hb G-Pest	15 – Hb Hasharon
2 – Hb Kurosaki	7 – Hb Kurosaki	12 – Hb Danesgah-Tehran	16 – Hb J-Rovigo
3 – $--/\alpha^{Hph I} \alpha$	8 – $--/\alpha^{Hph I} \alpha$	13 – Hb Stanleyville II	17 – Controle Normal
4 – $\alpha^{Hph I} \alpha / \alpha \alpha$	9 – $\alpha^{Hph I} \alpha / \alpha \alpha$	14 – Controle Normal	
5 – Controle Normal	10 – Controle Normal		
Fragmento F			
18 – Hb Campinas	22 – Hb Hasharon		
19 – Hb Kurosaki	23 – Hb J-Rovigo		
20 – $--/\alpha^{Hph I} \alpha$	24 – Controle Normal		
21 – $\alpha^{Hph I} \alpha / \alpha \alpha$			

Figura B
Fragmentos II, III e Exons 1 e 2



Fragmento II

- 1 – Hb G-Pest
- 2 – Hb Daneshgah-Tehran
- 3 – Hb Westmead
- 4 – Hb West One
- 5 – Controle Normal
- 6 – Controle Normal

Fragmento III

- 7 – Hb J-Rovigo
- 8 – Hb Daneshgah-Tehran
- 9 – Hb Hasharon
- 10 – Controle Normal

Exon 1

- 11 – Hb Kurosaki
- 12 – Hb Campinas
- 13 – --/ $\alpha^{\text{Hph I}}$
- 14 – $\alpha^{\text{Hph I}}\alpha/\alpha\alpha$
- 15 – Controle Normal

Exon 2

- 16 – Hb Hasharon
- 17 – Hb Stanleyville II
- 18 – Hb Daneshgah-Tehran
- 19 – Hb G-Pest
- 20 – Hb J-Rovigo
- 21 – Controle Normal