

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

“DETERMINAÇÃO DAS REGIÕES DE RECOMBINAÇÃO EM
HAPLÓTIPOS ATÍPICOS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME”

Alexandra Patrícia Zilli Vieira

Orientador: Dr. Fernando Ferreira Costa

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
graduação em Clínica Médica, área de
concentração Clínica Médica, para obtenção
do Título de Mestre.

Campinas – SP

2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



UNIDADE B. C.
N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
V673d
V. Ex.
TOMBO BC/42213
PROC. 16-278100
C D
PREÇO R\$ 1,00
DATA 2/10/00
N.º CPD

CM-00144798-8

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

V673d

Vieira, Alexandra Patrícia Zilli

Determinação das regiões de recombinação em haplótipos atípicos de pacientes com anemia falciforme / Alexandra Patrícia Zilli Vieira. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

Orientador : Fernando Ferreira Costa

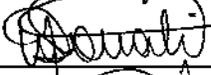
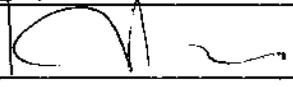
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Anemia Falciforme. 2. Recombinação (genética). 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:

1. Profª Dra Sandra Látimo Menosi Gualandio - 
 2. Profª Dra Maria de Látimo Sonati - 
 3. Profª Dra Leticia Leticia Costa - 
 4. _____
 5. _____
-

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

Data: 20/04/2000

À MINHA FAMÍLIA,

PELO ORGULHO QUE SEMPRE DEMONSTRARAM,
PELO CARINHO, PACIÊNCIA E APOIO PARA
QUALQUER DECISÃO AO LONGO DA MINHA VIDA.

AO FÊ,

“EU SEI E VOCÊ JÁ SABE, JÁ QUE A VIDA QUIS ASSIM
QUE NADA NESSE MUNDO LEVARÁ VOCÊ DE MIM
EU SEI E VOCÊ SABE QUE A DISTÂNCIA NÃO EXISTE
QUE TODO GRANDE AMOR
SÓ É BEM GRANDE SE FOR TRISTE
POR ISSO, MEU AMOR
NÃO TENHA MEDO DE SOFRER
QUE TODOS OS CAMINHOS ME ENCAMINHAM PRA VOCÊ
NÃO HÁ VOCÊ SEM MIM
E EU NÃO EXISTO SEM VOCÊ”

POR TODAS AS ALEGRIAS, TODA AJUDA, TODO
APOIO, INCENTIVO, AMOR, CONFIANÇA E
COMPANHEIRISMO, QUE TROCAMOS AO
LONGO DESTES 2 ANOS.

QUE TUDO ISTO CONTINUE PARA SEMPRE.

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr Fernando Costa, pela orientação, apoio, confiança e acima de tudo por dividir a satisfação que os resultados deste trabalho nos proporcionou.
- À Silvana Bordin, por me ensinar como deve ser um pesquisador de verdade.
- Ao Prof. Dr José Mengel, por me apresentar à Biologia Molecular.
- Às minhas amigas, Mônica, Daniela e Silvana, pelo intenso convívio durante todo este trabalho.
- À Patrícia, pelas longas conversas, que nossa amizade continue nos acompanhando nos distintos caminhos que traçamos.
- Aos amigos do laboratório, Natasha, Taís, Carol, Rodrigo, Marcelo, Arno, Simone, Lena, Carlos, Robertas, Angelinha, Maria Paula, Paulo, Marcela, Vanessa, Adriana, e todos os outros que passaram por lá.
- À Tereza e à Lillian, pelo exemplo de competência pessoal e profissional.
- Ao Fernando Lopes, Vagner, Malu, Simone e Tetê, por manterem o ambiente do laboratório muito descontraído.
- Aos meus amigos do CBMEG, André, Edson e Eneida, por todos os nossos divertidos encontros.
- A todos os pacientes portadores de anemia falciforme, escolhidos para este trabalho, que sempre compareceram aos chamados do laboratório de pesquisa.
- À Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro, pela organização e seriedade com que exercem suas funções.

ÍNDICE GERAL

ABREVIATURAS	8
ABSTRACT	9
RESUMO	11
INTRODUÇÃO	13
PROPRIEDADES DO LCR.....	15
HEMOGLOBINA S	18
HEMOGLOBINA FETAL.....	19
HAPLÓTIPOS DO “CLUSTER” DA GLOBINA BETA.....	21
OBJETIVO	25
CASUÍSTICA	26
MATERIAIS E MÉTODOS	27
1. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	27
2. CONFIRMAÇÃO DA MUTAÇÃO NO GENE BETA	28
3. DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO COMPLEXO DO GENE DA GLOBINA β	29
4. DETERMINAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLP) POR DIGESTÃO ENZIMÁTICA	29
5. DETERMINAÇÃO DE VARIAÇÕES POLIMÓRFICAS ATRAVÉS DE SSCP NÃO RADIOATIVO	31
6. CARACTERIZAÇÃO DAS REGIÕES MICROSATÉLITES ATRAVÉS DE PCR RADIOATIVO ...	35
7. SEQUENCIAMENTO.....	37
RESULTADOS	41
1. RFLP	41
2. RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DO SSCP NÃO RADIOATIVO	45
3. RESULTADOS DA ANÁLISE DAS REGIÕES MICROSATÉLITES POR PCR RADIOATIVO	48
4. SEQUENCIAMENTO.....	50
DISCUSSÃO	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

ABREVIATURAS

Kda – kilodaltons

Nm – nanômetros

Hb - Hemoglobina

Hb F - Hemoglobina Fetal

Hb S - Hemoglobina S

Hb A - Hemoglobina A

PCR - Polimerase Chain Reaction

SSCP - Single Strand Conformation Polymorphism

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

HSs - Hypersensitive Sites

DNA - Deoxyribonucleic Acid

DNase – DNA polimerase

LCR – Locus Control Region

FC - F Cells

FCP – F Cells Production

pb – pares de base

Kb – kilobases

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

ABSTRACT

Human beta globin gene complex spans a region of 70 kb and contains numerous sequence variants. Alleles within the cluster of polymorphic sites stretching from 5' of the ϵ -globin gene to 3' of $\psi\beta$ -globin gene show strong linkage disequilibrium; similar linkage disequilibrium exists for the alleles in the cluster of sites from 5' of the β globin gene to 17 kb downstream. No linkage disequilibrium exists between these two subclusters. The 9 kb region between the 5' and 3' clusters has therefore been proposed as a recombination "hot-spot". This study intends to investigate if the length of the repeats is haplotype specific and to narrow the β globin cluster in order to characterize the most approximate breakpoint. We described 13 sickle cell patients with at least one recombinant allele. β haplotypes were derived from the following RFLPs in the β globin gene cluster: Xmn I – 5' $^G\gamma$, Hind III - $^G\gamma$ and $^A\gamma$, Hinc II - $\psi\beta$, Hinc II – 3' $\psi\beta$, Hinf I – 5' β and Ava II β . RFLPs were analyzed using restriction enzyme analysis of DNA that was specifically amplified by the PCR. Furthermore, we selected 3 short tandem repeats (STR) throughout the β globin cluster – within the LCR - HS2 (TA repeat), between LCR and ϵ gene (CA repeat), and within the second intron (IVS2) of the $^G\gamma$ (TG repeat). These sequences were analyzed by radiolabeled PCR and observed in denaturing polyacrilamide gel. These microsatellites are commonly used as polymorphic markers but their potential functional role is poorly documented. In addition, we analyzed other sequences – three sequences located within a region of 8 kb between β LCR-HS2 (second DNase I hypersensitive site within the beta locus control region) and ϵ gene, one located 5' of the β globin gene and one located

3' of the β globin gene in HS3' by no-radiolabeled SSCP. We characterized by sequencing one microsatellite region located between LCR and ϵ gene, and a tandem repeat sequence $(AT)_xT_Y$ located -530 bp from the β globin gene cap site. In eight patients, the recombination occurred within a region of 2 kb between LCR and ϵ gene – seven alleles revealed a hybrid haplotype of Bantu/Benin and one revealed Bantu/Senegal. In three other cases we observed two breakpoints in the same allele – one located within a region of 2 kb between LCR and ϵ gene and the second located between δ and β genes. In two of these alleles we probably found a mosaic of a Bantu-type β LCR-HS2, a Benin β^A 5' subhaplotype and a Bantu 3' subhaplotype. The third allele appeared to be a mosaic of a Bantu-type β LCR-HS2, a Senegal 5' subhaplotype and a Bantu 3' subhaplotype. We also found two patients that were homozygous for Bantu haplotype, but in a Hind III A_γ polymorphic site their alleles presented a heterozygous pattern. It could be originated by point mutation exactly in this polymorphic site. Our data suggested that most of the atypical haplotypes were originated by recombination. The two most described recombination breakpoints were located between LCR and ϵ gene and between δ and β genes.

RESUMO

O complexo da globina beta humana compreende uma região de 70 kb e contém numerosos polimorfismos. O conjunto desses polimorfismos está em desequilíbrio de ligação com o gene da globina β^S e são denominados de haplótipos. O estudo desses haplótipos mostrou que a mutação da globina β^S teve origens independentes em diferentes regiões. Essas regiões dão a denominação aos haplótipos, desta forma os haplótipos clássicos são Bantu, Benin, Senegal, Camarões e Indiano. Nesse estudo foram caracterizados, do ponto de vista molecular, 13 pacientes que apresentaram haplótipos atípicos. Este estudo possibilitou a caracterização desses haplótipos e, nos casos de recombinação, permitiu identificar a região do provável ponto de quebra. Os haplótipos foram determinados pela análise dos seguintes sítios para RFLP: XMn I - 5' gene γG , Hind III - γG e γA , Hinc II - $\psi\beta$, Hinf I - 5' β e Ava II - β . Adicionalmente, foram selecionadas 3 regiões de repetições de dinucleotídeos, ao longo do "cluster" da globina beta - no interior do LCR-HS2 (repetição de TA), entre o LCR e o gene ϵ (repetição CA) e no interior do segundo intron do gene γG (repetição TG). Essas regiões foram analisadas por PCR radioativo e observadas em gel de poliacrilamida desnaturante. Regiões microsatélites são comumente usadas como marcadores polimórficos, porém seu papel funcional é fracamente documentado. Além disso, foram estudadas outras seqüências: 3 localizadas em uma região de 8 kb entre LCR-HS2 e o gene ϵ ; uma localizada 5' do gene β e outra localizada 3' do gene β , no sítio hipersensível 3' (HS3'), por SSCP não radioativo. Foram também caracterizadas por sequenciamento a região de repetição localizada entre LCR e o gene ϵ (repetição CA) e também uma região de repetição localizada na

posição -530 5' do gene β - (AT) \times Ty. Em 8 dos 13 alelos analisados, o ponto de quebra da recombinação ocorreu dentro de uma região de 2 kb entre LCR e gene ϵ - 7 alelos revelaram um haplótipo híbrido Bantu/Benin e 1 revelou o híbrido Bantu/Senegal. Em 3 outros casos nós observamos dois pontos de quebra no mesmo alelo - um localizado dentro de uma região de 2 kb entre LCR e o gene ϵ e o segundo localizado entre os genes δ e β . Em dois deles, provavelmente, existe um mosaico: Bantu na região do LCR/ subhaplótipo 5' Benin β^A / subhaplótipo 3' Bantu. O terceiro parece ser um mosaico do tipo Bantu na região do LCR/ subhaplótipo 5' Senegal/ subhaplótipo 3' Bantu. Foram também encontrados 2 pacientes homocigotos para haplótipo Bantu, mas no sítio polimórfico para Hind III no gene γA , seus alelos apresentaram padrão heterocigoto. Uma explicação possível para esse fato seria uma mutação de ponto exatamente neste sítio polimórfico. Nossos dados sugerem que a maioria dos haplótipos atípicos foram originados por recombinação. Os pontos de recombinação de elevada frequência ("hot-spots") foram localizados entre LCR e o gene ϵ e entre os genes δ e β .

INTRODUÇÃO

A hemoglobina humana (Hb A) é uma proteína globular com um diâmetro de aproximadamente 5,5 nm e um peso molecular de 64,4 kDa. A molécula consiste de dois pares de cadeias polipeptídicas globinas diferentes ($\alpha_2\beta_2$).

O “locus” da globina beta humana está localizado no cromossomo 11, em uma região que compreende aproximadamente 70 kb, e contém cinco genes, com expressão somente em células eritróides, dispostos na ordem em que aparecem durante o desenvolvimento ontogenético normal (5’- ϵ -G γ -A γ - δ - β -3’) (fig.1).

A região que controla o “locus” da globina beta (LCR) foi originalmente identificado pela presença de quatro sítios hipersensíveis à DNase I (HS1-4), localizados 6-18 kb a montante do gene ϵ (Stamatoyannopoulos *et al.*, 1994).

Cada sítio hipersensível à DNase I corresponde a uma sequência separada de elementos contendo numerosos sítios de ligação para fatores ubíquos e eritróide-específicos ativos em *trans* (Bungert *et al.*, 1995). O gene da cadeia α é duplicado em humanos e localizado no cromossomo 16. A forte homologia estrutural entre as cadeias α e β indica que eles surgiram a partir da duplicação de um único gene num ponto primitivo na evolução (Embury *et al.*, 1994; Li and Graur, 1991). O grupo heme, ferroprotoporfirina IX, está covalentemente ligado em cada uma das cadeias através de um sítio específico. Quando o ferro do grupo heme está no estado reduzido, pode se ligar reversivelmente a ligantes gasosos, tais como oxigênio ou monóxido de carbono (Embury *et al.*, 1994).

A produção de hemoglobina nos seres humanos se faz presente nos glóbulos vermelhos e é caracterizada por duas principais mudanças em sua composição. Durante os primeiros três meses de gestação, as células vermelhas contém três

tipos de hemoglobinas: Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$) e Portland ($\zeta_2\gamma_2$). Estas hemoglobinas embrionárias são sintetizadas no início do desenvolvimento humano. Na quinta semana de gestação, ocorre ativação da globina γ no fígado e a expressão do gene embrionário é silenciada. A principal característica da hemoglobina fetal é a alta afinidade pelo oxigênio, o que facilita o transporte do oxigênio através da placenta. No feto, a produção de cadeias de globinas γ é aproximadamente 50 vezes maior do que a expressão de cadeias β . Durante este período os eritroblastos e células vermelhas fetais coexpressam globinas γ e β . A síntese de cadeia β aumenta progressivamente durante o desenvolvimento intrauterino, chegando ao nascimento com 20 a 40% do total de hemoglobina. No adulto, aproximadamente 0.5 a 1% do total de hemoglobina representa Hb F, enquanto que 2% representam hemoglobina A_2 ($\alpha_2\delta_2$) e os 97% restantes são hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$) (Stamatoyannopoulos *et al.*, 1994). O controle da transcrição é regulado primariamente pela estrutura da cromatina e disponibilidade de múltiplas proteínas tecido específicas atuantes em *trans*. Estudos da estrutura da cromatina têm mostrado que o "cluster" inteiro da globina beta é mantido em uma conformação "ativa" por todo o desenvolvimento eritróide enquanto permanece empacotado numa conformação "inativa" em células não eritróides (Emerson, 1993). Uma vez ativado o "locus" cromossomal, os genes das globinas são, diferencialmente, regulados por fatores atuando em *trans* operando em promotores e "enhancers" específicos que estão associados com cada gene. O passo inicial mais importante na ativação do "locus" cromossomal é aparentemente regulado por sequências do LCR. Então, a expressão da globina é controlada por ativação global de um grande "locus" cromossomal (pelo LCR) e por

ativação local dos genes individuais (promotores individuais de cada uma das globinas) (Emerson, 1993).

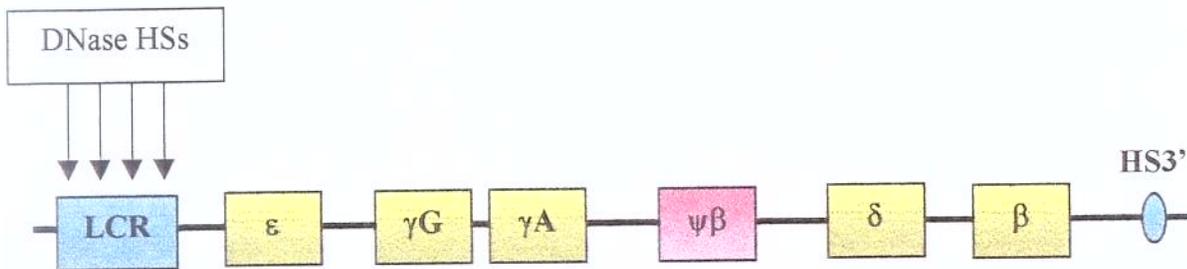


Fig. 1: “Cluster” da globina beta humana. São ao todo 5 genes expressos em fases distintas do desenvolvimento e na ordem em que estão aí dispostos. Cada um destes genes é composto por 3 exons intercalados por 2 introns. O gene que aparece em rosa é na verdade um pseudogene não funcional. Aproximadamente em uma sequência de 20kb se encontra o LCR e a distância que o separa do gene ϵ . Deste gene até o final do “cluster” são ao todo 55kb.

PROPRIEDADES DO LCR

LCRs são potentes elementos regulatórios caracterizados fenotipicamente por três propriedades principais: conferem expressão em níveis fisiológicos e tecido-específica aos genes ligados, ativam a transcrição dos genes de maneira independente da posição e dependente do número de cópias e além disso, determinam o tempo da replicação do DNA e a escolha da origem utilizada (Li *et al.*, 1999). LCRs são elementos incomuns, distintos de promotores, clássicos ativadores (“enhancer”, isto é, sequências regulatórias que atuam em cis, envolvidas na ativação transcricional), isolantes (“insulator”) cromossomais e regiões anexadas à matriz (“MARs”). Eles são mais complexos do que “enhancers” e “insulators”. De fato, eles incorporam as funções de ambos elementos. “Enhancers” ativam a transcrição, mas a

expressão gênica poderia estar ausente ou variável em decorrência de um efeito de posição (PE). Este efeito de posição resulta de efeitos positivos ou negativos da cromatina circundante ao gene. Diferente dos “enhancers”, LCRs reduzem os efeitos de posição. “Insulators” interrompem a comunicação entre um promotor e um outro elemento regulatório, quando colocados entre eles (Li *et al.*, 1999). A inclusão do LCR aumenta a expressão do gene da globina beta humana em um nível comparável à expressão do gene da globina beta endógeno em todos os animais transgênicos testados, indicando que o LCR tem uma forte atividade de “enhancer”.

A completa expressão dos genes do “locus” do gene da globina beta humana requer a associação do LCR. Estruturalmente, o LCR é definido pela presença de quatro domínios, os quais foram caracterizados como sítios hipersensíveis à DNase I (HSs). Estes domínios compreendem os elementos ativos do LCR (Pomerantz *et al.*, 1998). Como clássicos “enhancers”, a atividade individual de cada HS é independente da orientação. Muitas evidências indicam uma ligação entre a estrutura da cromatina do “locus” do gene da globina beta e a sua regulação. LCR contém uma atividade “enhancer” muito forte e funciona na formação de uma estrutura de cromatina aberta (ativa) que se estende sobre o “cluster” inteiro. A deleção do LCR afeta dramaticamente não somente a expressão dos genes β e γ globina, mas também a estrutura da cromatina e o tempo de replicação ao longo do “locus”. Entretanto, quando um grande fragmento de DNA, contendo o LCR inteiro, é ligado ao gene β globina, os modelos animais transgênicos expressam o gene, em níveis comparáveis ao endógeno. O alto nível de expressão do transgene indica muito bem a presença de “enhancers” no LCR (Hardison *et al.*, 1997). Quando ligado em *cis* com os genes globina individualmente, o LCR dirige a expressão em alto nível e eritróide específica de uma maneira que é largamente independente da

orientação e do sítio de integração dentro do genoma, isto é, não está sujeita a efeitos de posição. A maior atividade do LCR está associada com 5'HS2, HS3 e HS4, esta afirmação é consistente com a observação que a deleção do HS1 não está associada com nenhuma anormalidade na expressão do gene (Driscoll *et al.*, 1989). De fato, isto pode ser enfatizado pelo fenótipo da $\gamma\delta\beta$ -talassemia observado na deleção do tipo espanhola, a qual remove os sítios HS2-4. A consequência é que a cromatina do "cluster" é deixada em uma conformação que é inacessível para DNase I, e os genes globina não são expressos (Driscoll *et al.*, 1989). Portanto, esta análise da perda de função também mostra que o LCR é necessário para o estabelecimento e a manutenção de um domínio de cromatina aberta, no qual os genes globina são expressos (Hardison *et al.*, 1997). A região HS2 atua como um clássico "enhancer" em cultura de células e ratos transgênicos e foi inicialmente considerada como a contribuição mais significativa para a atividade "enhancer" do LCR. HS2, como simples fita, ativa a expressão do gene globina em cultura de células, mas não tem a função da expressão independente da posição em animais transgênicos (Stamatoyannopoulos *et al.*, 1994). A função de manter a cromatina aberta parece ser independente da atividade "enhancer" e está associada com HS3 (Baron, 1997). Existe a evidência recente que o LCR participa diretamente na modulação da concentração da Hb F e que certos sítios, juntamente com o LCR, podem afetar especificamente a transcrição dos diferentes genes dentro do "cluster" da globina beta (Embury *et al.*, 1994). O segmento do HS2 mostrou conter uma alternância purina/pirimidina em uma sequência referência de (AT)₁₀A(CA)₂(TA)CGT(AT)₁₁. Variações de nucleotídeos dentro desta sequência motivo e nas sequências vizinhas foram primeiramente descritas nos cromossomos de haplótipos Senegal e Benin na anemia falciforme. Estudos aprofundados em séries de pacientes homocigotos para

haplótipos Benin, Bantu, Senegal, Camarões e Indiano revelaram que cada haplótipo está em desequilíbrio de ligação com uma configuração específica desta sequência polimórfica, cada configuração sendo diferente da sequência referência publicada (Lobie and Elion, 1996). Para simplificar, este motivo pode ser escrito como $(AT)_X N_{12} (AT)_Y$, onde X e Y representam números variados de repetições. Grande progresso tem sido feito no estudo dos mecanismos de transcrição do gene da globina beta. As sequências regulatórias chaves e muitos dos fatores de transcrição que se ligam a elas têm sido identificados. Entretanto, a possibilidade de afetar o desenvolvimento embrionário ou reativar o gene γ somente agora apresenta alguns resultados potenciais. Este evento molecular é crítico para o avanço da terapia da anemia falciforme e talassemia beta, visto que níveis persistentemente altos da hemoglobina fetal são conhecidos por atenuar a gravidade clínica destas desordens. Por isso, o maior objetivo destas áreas da pesquisa é traduzir a compreensão dos mecanismos moleculares básicos em alternativas terapêuticas.

HEMOGLOBINA S

O período exato do aparecimento da mutação S não é conhecido com precisão, mas a mutação presente hoje, provavelmente, ocorreu simultaneamente ao tempo em que a malária se tornou endêmica. O estabelecimento da elevada prevalência dessa mutação certamente requereu um fator seletivo, provavelmente a malária (Embury *et al.*, 1994).

A alta concentração de hemoglobina nas células vermelhas (32 a 34g/dl) requer que esta proteína seja extremamente solúvel. A substituição da valina pelo ácido glutâmico, ocorrida no códon 6 do gene da globina β , resulta em

uma notável diminuição da solubilidade da Hb S quando desoxigenada. Esta substituição na cadeia dos aminoácidos ocorre devido a uma mutação classificada como uma transversão, isto é, troca de uma purina por uma pirimidina GAG (Glu)→GTG (Val) (Stamatoyannopoulos *et al.*, 1994).

A agregação da Hb S desoxigenada em polímeros é o evento primário na patogênese molecular da doença falciforme. Sob condições fisiológicas de pH, força iônica e temperatura existente na circulação das células vermelhas, o polímero assume a forma de uma fibra alongada, que geralmente se alinha com outras fibras, resultando na distorção em forma falciforme e uma notável diminuição da deformabilidade característica da célula vermelha.

HEMOGLOBINA FETAL

Em adultos normais, a síntese de hemoglobina fetal é reduzida a níveis muito baixos, geralmente inferior a 1% do total de hemoglobina. A Hb F é irregularmente distribuída e restrita a uma população de eritrócitos denominados “células F” (FC) (Boyer *et al.*, 1975). Características clínicas e laboratoriais de pacientes com anemia falciforme são influenciadas pela concentração de hemoglobina fetal. Desta forma, pacientes com níveis altos têm menos episódios dolorosos e sobrevida maior (Steinberg *et al.*, 1995). Os níveis de Hb F têm notável variação entre pacientes com Hb SS. A produção de Hb F pode ser influenciada por determinantes ligados em *cis* ao “cluster” do gene da globina β e por elementos em *trans* a estes genes. Entre os determinantes que atuam em *cis* incluem-se os haplótipos do “cluster” do gene da globina β (Steinberg *et al.*, 1995). Cada haplótipo está associado com outras variações polimórficas presentes neste “cluster”. Estas variações estão concentradas em regiões evolutivamente conservadas, ricas em sítios de

ligação para fatores de transcrição eritróide-específicos e ubíquos. Entre estes polimorfismos associados ao haplótipo está o LCR-HS2, localizado a 6 kb 5' do gene ϵ . O HS2 do LCR é polimórfico em pacientes com Hb SS. Outro polimorfismo compreende uma região de 500 pb, começando a 1.15 kb a montante do gene γ G. Essa seqüência contém um domínio para ligação de fator de transcrição que deve ser funcionalmente importante e haplótipo específico (Pissard and Beuzard, 1994). Adicionalmente, outra região importante parece ser um possível repressor do gene da globina β , com seqüência haplótipo variante (AT)xTy, está localizado 530 pb 5' deste gene e pode contribuir para modular a expressão do gene da Hb S (Berg *et al.*, 1991). Finalmente, uma deleção de 4 pb (AGCA), 5' do gene γ A, pode ser um elemento, atuando em *cis*, que aumenta a expressão de ambos os genes γ quando combinado com um fator atuante em *trans* (Lu and Steinberg, 1996). Algumas mutações na região dos promotores, embora não associadas com nenhum haplótipo em especial, elevam os níveis de Hb F e são responsáveis por alguns tipos de persistência hereditária da Hb F (Lu and Steinberg, 1996). Entre os elementos que atuam em *trans*, incluem-se o "locus" de produção de "células F" (FCP) ligado ao cromossomo X, que está associado com variação nos níveis de FC na anemia falciforme (Dover *et al.*, 1992). Outro "locus" foi mapeado no cromossomo 6q23 (Garner *et al.*, 1998). Além destes "locus" e dos fatores ligados ao "cluster" da globina β existem ainda outros fatores que podem interferir na concentração de Hb F, entre eles a idade e o sexo (Steinberg *et al.*, 1995). Entre estas variáveis, o "locus" FCP é o mais importante fator responsável pelos níveis de Hb F e responsável por 35 a 41% do total de variação de Hb F nos indivíduos portadores de anemia falciforme.

HAPLÓTIPOS DO “CLUSTER” DA GLOBINA BETA

Os genes β^S surgiram independentemente em pelo menos três regiões geograficamente distintas da África e em uma região da Ásia. Estão respectivamente ligados aos três mais comuns haplótipos do “cluster” do gene da globina beta: Benin (oeste da África Central), Senegal (oeste da África Atlântica) e Bantu (República Central Africana) (Bouhassira *et al.*, 1989). Um haplótipo menos frequente, o Camarões, descoberto em 1992 por Lapoumérioule *et al.*, difere dos demais nas regiões 5’ e 3’. Todos os portadores deste cromossomo pertencem ao grupo étnico Eton e tiveram sua origem no vale do rio Sanaga (África) (Lapoumérioule *et al.*, 1989). Os haplótipos parecem estar, em alguns casos, associados com características genéticas e hematológicas distintas da anemia falciforme, principalmente no que se refere à expressão do gene γG (Nagel *et al.*, 1985). Haplótipo pode ser, de uma maneira simplificada, referido como o “background” genético que acompanha o gene β^S . Este conjunto de sequências polimórficas provavelmente existiam no cromossomo antes do evento mutacional no gene β (Pagnier *et al.*, 1984). Desde a primeira descrição, por Kan e Dozy (1978), de um sítio polimórfico de restrição *Hpa* I em desequilíbrio de ligação com a mutação da Hb S, vários polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs) na vizinhança do gene da globina beta foram descobertos (Lapoumérioule *et al.*, 1989). Dados combinados dos padrões polimórficos de vários RFLPs no cromossomo têm permitido a descrição dos haplótipos do “cluster” da globina beta, que compreendem uma região de mais de 60 kb, indo desde 1 kb 5’ do gene ϵ até 8 kb a jusante do gene β (Pagnier *et al.*, 1984). Estes RFLPs definiram os haplótipos e são até hoje marcadores

genéticos eficientes para investigação da origem e propagação da mutação β^S (Lapoumerouille *et al.*, 1989). Ao todo são 20 RFLPs, presentes numa região total de 63 kb, no “cluster” da globina beta. Estes polimorfismos estão presentes em três grupos: uma parte localizada nos 34 kb 5’ ao “cluster” (5’ ao gene ϵ até 3’ ao pseudogene beta $\psi\beta$), a segunda localizada nos 9 kb que separa os dois subclusters e a terceira localizada nos 19 kb 3’ ao “cluster” (compreendem as regiões 5’ ao gene β até 17 kb a jusante) (Chakravarti *et al.*, 1984). Entretanto os haplótipos podem ser precisamente determinados usando apenas 7 dos sítios de restrição: *Xmn* I, *Hind* III nas regiões dos genes γG e γA , *Hinc* II no $\psi\beta$ e entre $\psi\beta$ e δ , *Hinf* I 5’ do gene β e *Ava* II no gene β (fig.2) (Powars, 1991). O padrão polimórfico de restrição de cada um dos haplótipos citados acima está descrito na tabela 1. Desta forma, a determinação destes haplótipos está baseada na presença ou ausência de diferentes sítios para enzimas de restrição. Além dos polimorfismos nos sítios de restrição, os haplótipos estão associados com variações na sequência de nucleotídeos, em determinadas regiões do “cluster”, que são características para cada um deles. As variações já determinadas são: região microsatélite localizada no HS2 do “locus control region” (repetição TA), (AT) x Ty localizado 5’ do gene β , deleção de 4 pares de bases localizada 5’ do gene γA , variações presentes nos promotores dos genes γG e γA e intron II do gene γA (Steinberg, 1996).

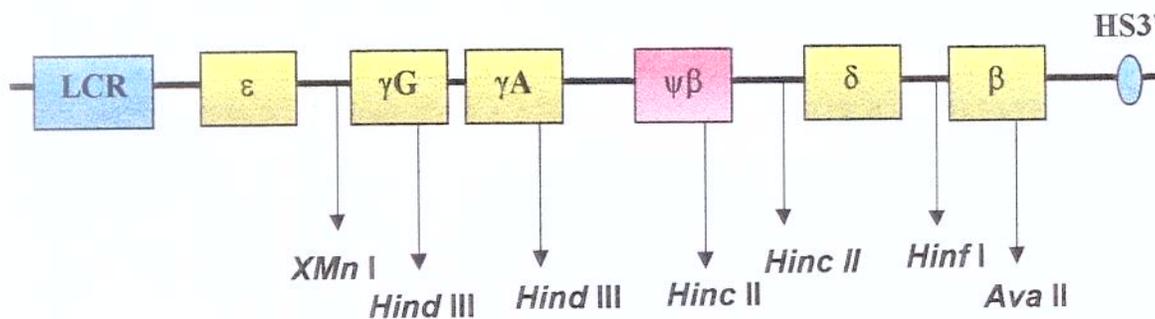


Fig. 2: “Cluster” da globina beta no cromossomo 11. As setas apontam para os sítios polimórficos, identificáveis por endonucleases de restrição, utilizados neste trabalho.

Tabela 1: Padrão de restrição dos cinco haplótipos principais, para os sete sítios analisados neste trabalho.

HAPLÓTIPO	<i>XMn</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Hind</i> III	<i>Hinc</i> II	<i>Hinc</i> II	<i>Hinf</i> I	<i>Ava</i> II
BANTU	-	+	-	-	-	-	+
BENIN	-	-	-	-	+	-	+
SENEGAL	+	+	-	+	+	+	+
INDIANO	+	+	-	+	+	-	+
CAMARÕES	-	+	+	-	+	+	+

Vários relatos na literatura descrevem padrões de haplótipos diferentes daqueles classicamente descritos. De maneira geral, esses haplótipos são genericamente denominados de “haplótipos atípicos” (Gonçalves *et al.*, 1994; Nagel *et al.*, 1985; Ofori-Acquah *et al.*, 1999; Pagnier *et al.*, 1984; Powars, 1991; Smith *et al.*, 1998; Srinivas *et al.*, 1988; Zago *et al.*, 2000). A origem desses haplótipos atípicos ainda não é completamente conhecida. Vários deles parecem originar-se por recombinações, mutações de ponto nos sítios de restrição ou conversão gênica, e alguns poderiam representar novos

haplótipos, diferentes dos já conhecidos (Zago *et al.*, 2000; Gonçalves *et al.*, 1994; Ofori-Acquah *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1998; Flint *et al.*, 1998).

Dessa forma, o estudo desses haplótipos atípicos é importante pelas informações que podem advir da localização dos prováveis pontos de recombinação no conjunto de genes da globina beta, bem como da contribuição que podem fornecer para avaliar a associação entre diferentes haplótipos e gravidade clínica da anemia falciforme.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

OBJETIVO

Determinar as características moleculares e possíveis regiões de recombinação de haplótipos atípicos detectados em pacientes com anemia falciforme no Brasil.

CASUÍSTICA

Foram selecionados para este estudo 13 entre 98 pacientes homozigotos para anemia falciforme, em seguimento no Ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp. Além destes, foram analisadas também 2 amostras encaminhadas pela Fundação Oswaldo Cruz do Estado da Bahia. Esses pacientes foram estudados porque apresentaram haplótipos diferentes dos 5 classicamente descritos (Bantu, Benin, Senegal, Camarões e Indiano). Não houve seleção quanto à idade ou sexo. As amostras provenientes da Unicamp são referidas com números de 1A até 98A, enquanto que as 2 amostras provenientes da Bahia estão identificadas com os números 0175 e 5146. Dentre os paciente selecionados há uma família de 5 pessoas, referidas como 18A, 36A, 40A, 76A e 88A. Para análise do paciente 5A, a família foi convocada, tendo comparecido 2 irmãos e o pai. O pai e um dos irmãos apresentaram a mutação β^S em heterozigose, o outro irmão foi diagnosticado normal, isto é, homozigoto para gene da globina β^A .

MATERIAIS E MÉTODOS

1. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA foi extraído de leucócitos presentes no sangue periférico. O sangue foi colhido em frasco estéril, em um volume total de 10-20ml com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 10% como anticoagulante. Este sangue foi então centrifugado por 10 min a 1200g em centrífuga refrigerada (**Beckman**) a 4°C, para separação do plasma. Após descarte do plasma, as hemácias foram lisadas através da adição de uma solução de cloreto de amônio NH_4Cl 0,144M (5X o volume de células) e bicarbonato de amônio NH_4CO_3 0,01M (0,5X o volume de células). A mistura foi centrifugada por 15 min a 3000 rpm e o sobrenadante foi descartado, procedimento que se repetiu até que o botão de leucócitos ficasse claro no fundo do tubo. Em seguida foi adicionado 1 ml de DNazol (**Life Technologies, Inc. Grand Island, N.Y.**), reagente responsável por isolar DNA genômico de amostras líquidas ou sólidas. O DNA foi precipitado com adição de 30 ml de etanol absoluto gelado, lavado com etanol 70% e solubilizado em um volume de água deionizada proporcional ao tamanho do precipitado.

2. CONFIRMAÇÃO DA MUTAÇÃO NO GENE BETA

O diagnóstico de anemia falciforme foi realizado com base em estudos clínicos e laboratoriais, incluindo eletroforese de hemoglobina e dosagem de Hb A₂ e Hb F. Além disso, a análise familiar foi feita na maioria dos casos. Adicionalmente, o diagnóstico foi confirmado pela análise molecular da mutação β^S . Isto foi feito através da amplificação gênica desta região, seguida de digestão com enzima de restrição *Dde* I (Amersham) e detecção dos produtos digeridos em gel de agarose 2% em tampão TAE (Tris-EDTA-Acetato) corado com brometo de etídio (Chehab *et al.*, 1987). A amplificação se deu através de PCR (Polimerase Chain Reaction), reação em cadeia mediada pela polimerase. A sequência, a posição dos primers e as condições de temperatura estão descritas na tabela 2.

Tabela 2. Direção, posição, sequência e condições de temperatura dos primers que confirmam mutação no códon 6 da globina beta

SEQUÊNCIA DO PRIMER 5'→3'	DIREÇÃO	CONDIÇÕES DA REAÇÃO	POSIÇÃO
TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG	→	• 30" a 94°C	61976
TCATTCGTCTGTTCCCATTC	←	• 30" a 55°C	62313
		• 50" a 72°C	

→ primer sense

← primer antisense

3. DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO COMPLEXO DO GENE DA GLOBINA β

A análise inicial para seleção dos pacientes com haplótipos atípicos incluiu 7 sítios polimórficos de restrição, analisados por RFLP, e uma seqüência polimórfica e haplótipo específica, presente no HS2 do LCR (posições 8486/8992, segundo coordenadas do Genbank), analisada por SSCP não radioativo. A partir destes resultados, a caracterização desses haplótipos atípicos foi levada a efeito por um conjunto de procedimentos cujos objetivos foram analisar as regiões já classicamente descritas, analisar outros sítios que pudessem contribuir para estreitar as regiões dos possíveis pontos de quebra nas recombinações e, ainda, ampliar as regiões estudadas nas direções 5' e 3'. Desse modo, nesse trabalho foram empregadas as seguintes metodologias: determinação dos polimorfismos nos fragmentos de restrição de 7 regiões (RFLP), através de amplificação por PCR seguida por digestão enzimática, SSCP não radioativo de 5 regiões, determinação dos polimorfismos no tamanho de 3 regiões microsátélites, por eletroforese em gel de poliacrilamida e, finalmente, sequenciamento de regiões previamente selecionadas.

4. DETERMINAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLP) POR DIGESTÃO ENZIMÁTICA

Os haplótipos clássicos de 98 pacientes homozigotos para HbS foram determinados usando metodologia descrita por Sutton et al (Sutton *et al.*, 1989). Os primers, posições e direções estão descritos na tabela 2. Para realização de todos os PCRs descritos neste trabalho, utilizamos o

termociclador da **MJ Research**. Todos os PCRs apresentaram volume final de 50µl constituídos de: 500ng de DNA genômico, 10mM de Tris-HCl (pH 8.0), 50mM KCl, 1mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 50% glicerol, 2mM de MgCl₂, 0.4mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 50ng de cada primer (sense e antisense) e 2.5U de *Taq* polimerase (**Biotoools-Madrid, Spain**).

As condições de tempo e temperatura para PCRs das regiões de RFLP foram padronizados em: 30" a 94°C, 30" a 55°C e 50" a 72°C repetidos por 35 ciclos, contando com uma desnaturação inicial de 5' a 94°C e uma extensão final de 7' a 72°C.

Os produtos dos PCRs foram observados em gel de agarose a 1.5% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

Amplificamos ao todo 7 fragmentos contendo sítios polimórficos ao longo do "cluster" do gene da globina beta. Estes fragmentos foram digeridos com endonuclease de restrição específica (Sutton *et al.*, 1989). Os sítios polimórficos contidos em cada um dos fragmentos amplificados estão descritos na tabela 3. A digestão foi feita partindo-se de 10µl do PCR, 2.5U da enzima de restrição; 1.5µl do tampão ótimo para atividade da enzima e uma quantidade de água suficiente para um volume final de 15µl de reação. A mistura foi colocada overnight em banho-maria a 37°C. Os produtos de digestão foram separados em gel de agarose a 1.5% corado com brometo de etídio e visualizado através da luz ultravioleta.

Tabela 3. Direções, posições e sequências dos primers indicados para RFLP e enzima de restrição específica para cada um dos fragmentos

PRIMER	SEQUÊNCIA 5'→3'	DIREÇÃO	POSIÇÃO	ENZIMA DE RESTRICÇÃO	GENE
0	AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	→	33862	XmnI	5' γG
1	AGGAGCTTATTGATAACCTCAGA	←	34518		
2	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	35422	HindIII	γG
3	AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	←	36203		
3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	40358	HindIII	γA
4	TAAATGAGGAGCATGCACACAC	←	41119		
5	GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	→	46426	HincII	ψβ
6	ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	←	47126		
7	TCTGCATTGACTCTGTTAGC	→	49476	HincII	3'ψβ
8	GGACCCTAACTGATATAACTA	←	50089		
9	CTACGCCTGACCTCATAAATG	→	60906	HinfI	5'β
10	CTAATCTGCAAGAGTGTCT	←	61291		
11	TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG	→	61976	AvaII	β
12	TCATTGCTCTGTTTCCATTTC	←	62313		

→ primer sense

← primer antisense

5. DETERMINAÇÃO DE VARIAÇÕES POLIMÓRFICAS ATRAVÉS DE SSCP NÃO RADIOATIVO

Juntamente com o RFLP, utilizamos o SSCP não radioativo (Single Strand Conformation Polymorphism), isto é, polimorfismo de conformação de fita simples de DNA (Orita *et al.*, 1989) como método de detecção de variações na sequência de nucleotídeos. Analisamos uma sequência de repetição presente no LCR-5'HS2. Esta sequência foi escolhida por 2 motivos: 1. É uma

sequência altamente variável e haplótipo específica (Périchon *et al.*, 1993; Oner *et al.*, 1992); 2. A sequência que a separa do restante do “cluster” é também definida como “hot-spot” de recombinação (Oner *et al.*, 1992). Os primers utilizados para o PCR desta região, bem como as condições em que foram realizados o PCR e o SSCP, estão descritos na tabela 4. Além desta, também foram analisadas 3 regiões localizadas entre o LCR e o gene ϵ , regiões estas nunca anteriormente descritas. A primeira delas está localizada entre as posições 10523 e 11184 do “cluster” da globina beta, segundo coordenadas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>-“locus” HUMHBB). Essa região foi amplificada com os primers descritos na tabela 4. Como o método tem maior eficiência com fragmentos menores do que 300pb, este amplificado foi submetido à digestão com a enzima de restrição *Hpa* II. Os fragmentos resultantes da digestão foram analisados utilizando o aparelho **Phast System (Pharmacia Biotech - Upsala, Sweeden)**. A segunda região a ser analisada está localizada entre as posições 16460 e 17000. O fragmento desta região foi digerido com a enzima *Ava* II e os produtos da digestão foram analisados segundo condições descritas na tabela 4. A terceira região analisada está localizada entre as posições 17959 e 18539. Este fragmento foi digerido com a enzima de restrição *Bsl* I e seus produtos foram analisados segundo condições descritas na tabela 4. Além dessas, foram analisadas 2 regiões presentes na posição 3’ do “cluster”. A primeira delas localizada entre as posições 61350 e 61889, na região 5’ do gene β , mais especificamente na região onde se encontra a sequência (AT) x Ty, já foi descrita como polimórfica e haplótipo específica por diversos autores (Ragusa *et al.*, 1992). O amplificado desta região foi digerido com *Fok* I e os produtos da digestão analisados pelas condições descritas na tabela 4. A segunda sequência analisada 3’ ao “cluster” está localizada entre as posições 1995 e 2455,

segundo coordenadas do GenBank (“locus” HSDNA 11). Este fragmento está contido em uma região reconhecida como HS3’ (sítio hipersensível a DNase localizado na porção 3’ do “cluster”). A análise desse sítio também está sendo realizada pela primeira vez. Apesar de ser um fragmento de 460 pb, a padronização das condições de corrida foram conseguidas sem que houvesse a necessidade de digeri-lo. Essas condições, bem como as seqüências dos primers, estão descritas na tabela 4. A padronização de todas as 5 regiões descritas acima envolveu a análise de pelo menos 10 pacientes controle para haplótipos homozigotos Bantu e Benin e heterozigoto Bantu/Benin. Para o desenho de todos os primers foi utilizado o programa GeneRunner versão 3.00. Aos produtos obtidos da digestão, adicionamos uma solução de desnaturação contendo 95% de formamida, 10mM de EDTA pH 8.0, 0.1% de azul de bromofenol e 0.1% de cianol de xileno. A proporção do volume de PCR: solução desnaturante variou de acordo com a intensidade da banda no gel de agarose. Esta mistura foi a seguir desnaturada por aquecimento a 95°C por 5 min, colocada imediatamente em banho de gelo e 4µl foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 20% ou 12.5% em tampão 0.112M acetato e 0.112M Tris pH6.4, homogêneo, de tamanho 43X50X0.45mm. A corrida foi realizada em tampão L-alanina 0,88M e Tris 0.25M em agarose 3% IEF (isoeletrofocalização) pH8.8. As condições das corridas foram padronizadas e estão descritas na tabela 4. A coloração dos géis foi realizada automaticamente pelo aparelho Phast System, seguindo as etapas descritas abaixo:

1. Ácido tricloroacético 20% por 5 minutos a 26°C;
2. Glutaraldeído 5% por 5 minutos a 50°C;
3. Água deionizada por 2 minutos a 50°C (2X);
4. Nitrato de prata 0.4% por 8 minutos a 40°C;

5. Água deionizada por 30 segundos a 30°C (2X);
6. Carbonato de sódio 2.5%, contendo 100µl de uma solução de formaldeído a 37%, por 30 segundos a 30°C seguida por uma outra incubação de 5 minutos a 30°C;
7. Ácido acético 5% por 2 minutos a 50°C;
8. Glicerol 13% por 3 minutos a 50°C.

Tabela 4. Sequência dos primers, condições do PCR e condições da corrida do SSCP não radioativo .

SEQUÊNCIA DOS PRIMERS 5'→3'	DIREÇÃO	CONDIÇÕES DO PCR*	GENE	CONDIÇÕES DA CORRIDA
AAGCTTCAGTTTTTCCTTA CAAGATAAATATTTGATTCACA	→ ←	1' 94°C 1' 55°C 1' 72°C	LCR-HS2 (8486/8992)	GEL 20%, 150V, 10mA, 15°C, 350vh
TGGTACTTGCAGGACGAAGG TCACAGTCTCTACCTCAGAATTGGC	→ ←	1' 94°C 1' 62°C 1' 72°C	LCR -ε (10523/11184)	GEL 12.5%, 150V, 10mA, 15°C, 300vh
TGCCTTCATACTGTGGATCTGTAGC AGGTTGCAGTGAGCCGAAATC	→ ←	30'' 94°C 30'' 60°C 50'' 72°C	LCR -ε (16460/17000)	GEL 20%, 150V, 10mA, 15°C, 300vh
CAGATCATGAGGTCAAGAGATCGAG GTAGAGCTGAAACTGGAAGTTGGG	→ ←	30'' 94°C 30'' 62°C 50'' 72°C	LCR -ε (17959/18539)	GEL 20%, 150V, 10mA, 10°C, 350vh
CCCATTGATAGTCACAC CTTTGCAAGTGTATTTACG	→ ←	30'' 94°C 30'' 53°C 50'' 72°C	5' β (61350/61889)	GEL 12.5%, 150V, 10mA, 15°C, 170vh
GGCTACAGTTGAACAGATGGACCA TTACCACAAACCTGAAGTAGGC	→ ←	30'' 94°C 30'' 60°C 50'' 72°C	HS3' ** (1995/2455)	GEL 20%, 150V, 10mA, 10°C, 220vh

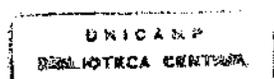
* estas condições foram repetidas 35 ciclos tendo em adicional um ciclo inicial de 5' a 94°C e uma extensão final de 7' a 72°C.

** segundo coordenadas do GenBank -locus HSDNA11

6. CARACTERIZAÇÃO DAS REGIÕES MICROSATÉLITES ATRAVÉS DE PCR RADIOATIVO

Utilizamos essa metodologia (Windsor *et al.*, 1994) na análise de 3 regiões microsátélites presentes ao longo do “cluster” da globina beta. As 3 regiões analisadas são as seguintes: região localizada no HS2-LCR, entre as posições 8805 e 9029, onde existe microsátélite de repetição TA; região localizada entre LCR e o gene ϵ , entre as posições 13169 e 13329, região microsátélite de repetição CA e intron II do gene γ^G , entre as posições 35469 e 35656, onde existe microsátélite de repetição TG. As sequências microsátélites foram selecionadas de acordo com coordenadas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/~locus> HUMHBB). A sequência e posição de cada par de primers estão descritas na tabela 5.

O experimento envolve a realização de um PCR contendo: 500ng de DNA genômico, 10mM de Tris-HCl (pH 8.0), 50mM KCl, 1mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 50% glicerol, 2mM de $MgCl_2$, 800ng de cada primer (“sense” e “antisense”), 2 μ M de cada um dos desoxinucleotídeos trifosfato, 5U de *Taq* polimerase (Biotools), 4 μ l de gelatina 0.2%, 23.5 μ l de água e 1 μ l de [$\alpha^{32}P$] dCTP para cada 100 μ l de reação. A 1 μ l deste produto foram adicionados 7 μ l da solução desnaturante decrita no item 4. A mistura foi desnaturada a 95°C por 5 minutos, colocada em banho de gelo e aplicada em gel desnaturante de poliacrilamida 6%. Este gel é composto por: 80ml de instagel, 466 μ l de persulfato de sódio e 33.3 μ l de Temed. O instagel foi preparado utilizando: 168g de uréia, 1.68g de bisacrilamida, 30.32g de acrilamida, 40ml de tampão TEB 10X (Tris-EDTA-Borato) e água suficiente para volume final de 400ml



de gel. Para corrida foram utilizados 2 tampões distintos, um colocado na parte superior da cuba de eletroforese, composto por 500ml de TEB 0.5X e um outro tampão na parte inferior composto por 40ml de TEB 10X e 80ml de acetato de sódio 3M – pH5.2 diluídos em água suficiente para 480ml. A corrida foi realizada a 4°C, 60W por 2.5 horas, o gel foi seco e exposto em filme de raio-X (**Hiperfilm-Amersham**) por 1 dia.

A análise dos resultados foi feita por critério de comparação com pacientes controle para os haplótipos mais comuns: Benin, Bantu em homozigose e Benin/Bantu em heterozigose.

Tabela 5. Sequência, direção, condições da reação e gene onde se encontram os primers utilizados no PCR radioativo.

SEQUÊNCIA DOS PRIMERS 5'→3'	DIREÇÃO	CONDIÇÕES DA REAÇÃO	GENE
CCACCTCAAACGGCATCATAAAG AGCCTGATTCTGCCGCTTCTAG	→ ←	1' 94°C 2' 53°C 1' 72°C	* HS2-LCR
TGGTCACTTFAGCCCTCACG AGAGTCTGCATGAGTTAGTTGC	→ ←	1' 94°C 2' 53°C 1' 72°C	* LCR-ε
GGGCAAAGTATGTCCAGG TCTTGTTATCTTCTTGCCAGGATG	→ ←	30'' 94°C 1'15'' 55°C 15'' 72°C	** IVS-II γG

→ primer sense

← primer antisense

* estas condições foram repetidas em 35 ciclos, contando com uma desnaturação inicial de 5' a 94°C e uma extensão final de 7' a 72°C.

** as condições para análise de γG foram repetidas em 30 ciclos, contando com 5' de desnaturação inicial à 94°C e 7' de extensão final à 72°C.

7. SEQUENCIAMENTO

Foram selecionadas 2 regiões para sequenciamento: 1. sequência microsatélite de repetição CA, localizada entre LCR e o gene ϵ ; 2. região 5' ao gene β (-530 β). O objetivo ao selecionar a primeira foi caracterizar o número de repetições CA, que nunca havia sido analisado anteriormente. Em relação à segunda, através da região -530 β , seria possível confirmar o haplótipo definido pelos métodos que utilizamos. A sequência (AT) x Ty, presente na região 5' β , é sabidamente haplótipo-específica e sua variação tem sido confirmada por diversos autores (Ragusa *et al.*, 1992; Elion *et al.*, 1992; Berg *et al.*, 1991; Labie and Elion, 1996; Lu and Steinberg, 1996). Além dessas regiões descritas acima, a região microsatélite localizada no HS2 do LCR (repetição TA) foi clonada e sequenciada em dois pacientes (18A e 5A). Isso porque esses pacientes apresentaram um padrão polimórfico indeterminado no PCR-radioativo dessa região. A clonagem foi realizada seguindo especificações do Kit SureCloneTM Ligation Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc). O sequenciamento foi realizado da mesma forma dos demais, porém no lugar do PCR, foi utilizado DNA purificado dos clones obtidos. O procedimento para a purificação dos clones seguiu instruções do Kit ConcertTM Rapid Plasmid Miniprep System (Gibco-BRL). No total foram sequenciados 10 clones para cada um dos pacientes. As sequências dos primers utilizados para o PCR, bem como a sequência do primer interno e as condições utilizadas na reação de sequenciamento estão descritos na tabela 6. As reações de sequenciamento seguiram o método de Sanger *et al* (Sanger *et al.*, 1977). Para tanto, foi utilizado o kit Thermo Sequenase radiolabeled

terminator cycle sequencing – **Amersham Pharmacia Biotech**, Cleveland, Ohio.

O PCR das regiões -530 β e CA repeat foi feito exatamente nas mesmas condições citadas nos itens SSCP não radioativo e PCR radioativo, respectivamente. O produto de PCR foi preparado com 10U da enzima *exonuclease* (**Amersham Pharmacia Biotech**) e 4U da enzima *SAP*- fosfatase alcalina de camarão (shrimp alkaline phosphatase) (**Amersham Pharmacia Biotech**) seguido de aquecimento à 37°C por 15 minutos e 80°C por mais 15 minutos sucessivamente. A reação de sequenciamento foi realizada em 26mM tris-HCl pH 9.5, 6.5mM MgCl₂, 8U de enzima *Thermo Sequenase* polymerase, 2.5-5 pmol do primer interno, 2.5 μ l do PCR purificado (não foi medida a concentração em μ g/ μ l) e o volume final completado para 20 μ l com água deionizada. Este volume foi dividido em quatro tubos do tipo “eppendorf”, cada um deles com uma mistura de 2 μ l de uma solução contendo os quatro nucleotídeos (G, A, T, C) misturados na mesma proporção (Nucleotide Master Mix) e 0.5 μ l de [α -³³P]ddNTP (1500Ci/mmol, 450 μ Ci/ml), onde d=A, T, C ou G. Os primers e as condições das reações estão descritas na tabela 6.

Tabela 6. Sequência dos primers e condições das reações utilizadas no sequenciamento das regiões descritas

PRIMERS DA REAÇÃO DE PCR	PRIMER INTERNO DO SEQUENCIAMENTO	CONDIÇÕES DA REAÇÃO*	REGIÃO
CCACCTCAAACGGCATCATAAAG(→) AGCCTGATTCTGCCGCTTCTAG(←)	CAAGATAAATATTTGATTCACA (←)	30" 94°C 30" 58°C 50" 72°C	HS2-LCR (AT) _x N(AT) _y
TGGTCACTTTAGCCCTCACG (→) AGAGTCCTGCATGAGTTAGTTGC (←)	AGAGTCCTGCATGAGTTAGTTGC (←)	30" 94°C 30" 58°C 50" 72°C	LCR-e CA repeat
CCCATTGATAGTCACAC (→) CTTTGCAAGTGTATTACG (←)	TATTAGCATGCATGAGC (→)	30" 94°C 30" 53°C 50" 72°C	5' β (AT) _x T _y

* condições repetidas em 30 ciclos, contando com 5' de desnaturação inicial à 94°C e 7' de extensão final à 72°C.

→ primer sense

← primer antisense

À reação de sequenciamento foram adicionados 4µl de uma solução composta por 95% de formamida, 20mM de EDTA, 0.05% de azul de bromofenol e 0.05% de xileno cianol. Esta solução é denominada "Stop solution" devido à característica da formamida de interromper a reação e também de desnaturar a dupla fita de DNA.

A concentração do gel utilizado para corrida do sequenciamento foi de 6%. Este gel é composto por 5.7g/0.3g de Acrilamida/Bis-acrilamida, 42-50g de Uréia 7-8.3M, 5ml de tampão 20X tolerante ao glicerol e aproximadamente 45ml de água, perfazendo um total de 100ml de gel. O tampão citado acima é composto por 216g de Tris, 72g de Taurina, 4g de Na₂EDTA.2H₂O e água deionizada suficiente para 1000ml de tampão. O tampão de corrida é o mesmo, porém diluído a uma concentração de 0.8X. Para a montagem do gel, utilizamos placas de 33X40 cm, com gradiente de espessura de 0.25 a 0.75 mm. A voltagem utilizada para a pré-corrída de uma hora foi 80V, após carregamento do gel com as amostras, passamos para uma voltagem de 65V e

a corrida se desenvolveu por aproximadamente 2:30hs sob uma temperatura de 55°C. Depois de secado a uma temperatura de 80°C por 1h30min, o gel foi submetido a exposição em filme de raio X (**Hiperfilm-Amersham**) por aproximadamente 24 horas e revelado em seguida.

Uma síntese de todas as regiões analisadas pelos métodos descritos encontra-se na figura 3.

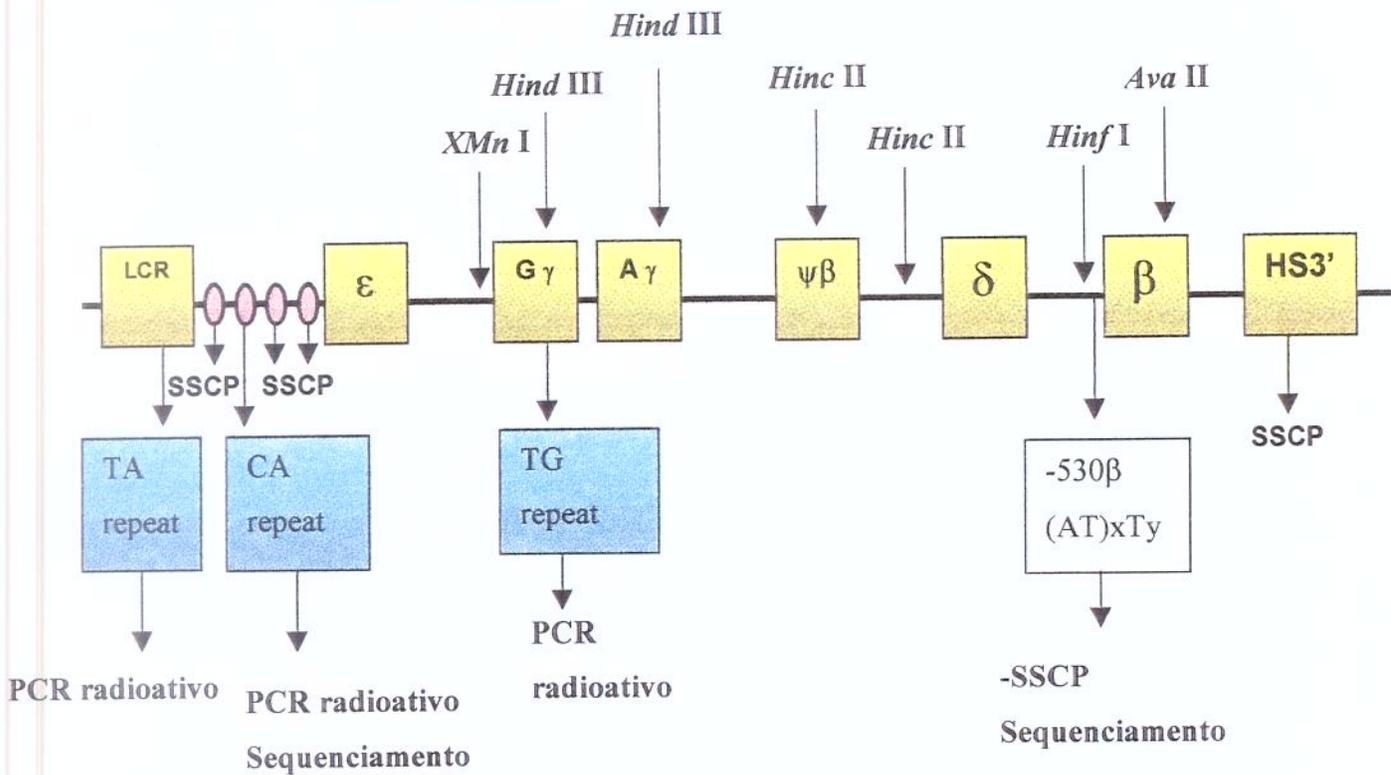


Fig. 3: Síntese dos experimentos realizados neste trabalho. São ao todo 7 sítios de restrição para RFLP, 5 seqüências analisadas por SSCP não radioativo, 3 seqüências microsatélites analisadas por PCR radioativo e 2 seqüências analisadas por sequenciamento. As regiões analisadas por SSCP não radioativo, localizadas entre LCR e o gene ε, foram escolhidas com o objetivo de estreitar o ponto de recombinação localizado nesta região. Os resultados demonstraram que estas regiões são haplótipo específicas, o que facilitou bastante a conclusão do trabalho.

RESULTADOS

Para a construção dos haplótipos foi assumido que o genótipo seria uma combinação de um haplótipo típico (Bantu, Senegal, Benin, Camarões e Indiano) e um haplótipo atípico, preferencialmente à presença de dois haplótipos atípicos. De acordo com convenção adotada na literatura (Ofori-Acquah *et al.*, 1999; Zago *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1998). Dessa forma, em 12 dos 13 pacientes observados, foram combinados um haplótipo comum e outro atípico (cinco Benin/atípico e sete Bantu/atípico). Entretanto, a combinação de dois haplótipos atípicos foi a melhor explicação encontrada para o padrão polimórfico apresentado pelo paciente 5A.

1. RFLP

Os padrões encontrados através da análise por RFLP estão descritos na tabela 7.

Tabela 7. Resultados de haplótipos determinados por RFLP

PACIENTES	PADRÃO RFLP	HAPLÓTIPO
18A/36A/40A/76A/88A*	----+--+/-+-----+	Benin/Bantu
81A/32A*	----+--+/-+-----+	Bantu /Benin
82A/28A	-+-----+ /++-+++++	Bantu/Senegal
5A/83A	----++++/-+-----+	Bantu /ND
0175/5146	-+-----+/-+-----+	Bantu /ND

* famílias

ND = não determinado

As figuras 5, 6, 7, 8, 9 e 10 trazem exemplos de digestões encontradas em cada um dos sítios de restrição. Os números colocados ao lado direito de cada uma das figuras representam o tamanho estimado do fragmento em pares de base.

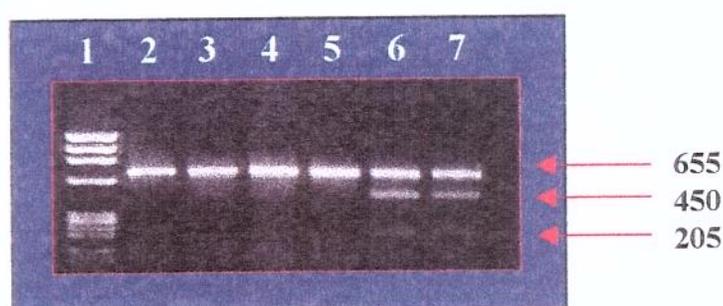


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos digeridos com enzima *Xmn* I (5' gene ϵ). 1, marcador ϕ X174 RF DNA/Hae III (**Gibco Brl**), 2, fragmento amplificado (sem digestão); 3, 4, 5, pacientes homocigotos (-/-); 6 e 7 pacientes heterocigotos (-/+).

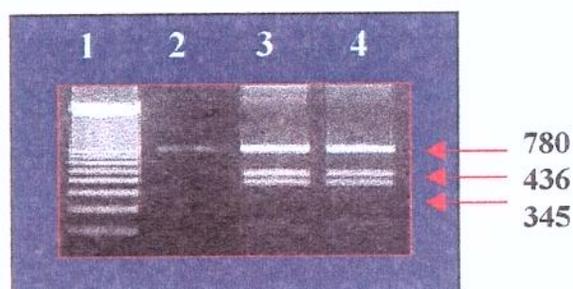


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos digeridos com enzima *Hind* III (IVS II do gene γ G). 1, marcador ladder 1kb (**Gibco Brl**), 2, fragmento amplificado (sem digestão); 3 e 4 pacientes heterocigotos (-/+)

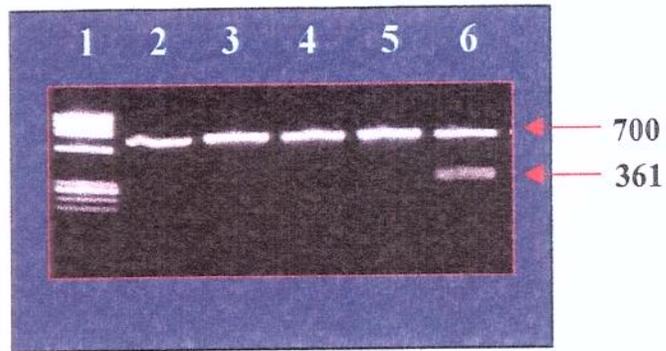


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos digeridos com enzima *Hinc* II (pseudogene β). 1, marcador ϕ X174 RF DNA/Hae III (**Gibco Brl**), 2, fragmento amplificado (sem digestão), 3, 4 e 5, pacientes homocigotos (-/-), 6, paciente heterocigoto (-/+).

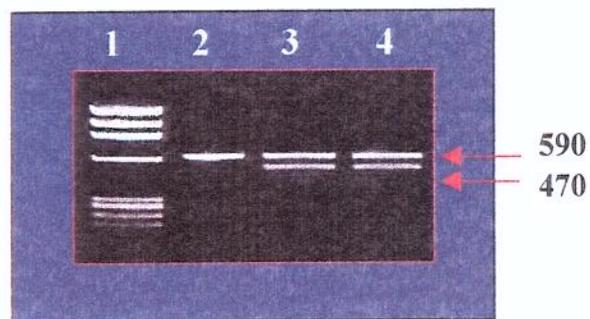


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos digeridos com enzima *Hinc* II (localizado entre pseudogene β e o gene δ). 1, marcador ϕ X174 RF DNA/Hae III (**Gibco Brl**), 2, fragmento amplificado (sem digestão); 3 e 4 pacientes heterocigotos (-/+)

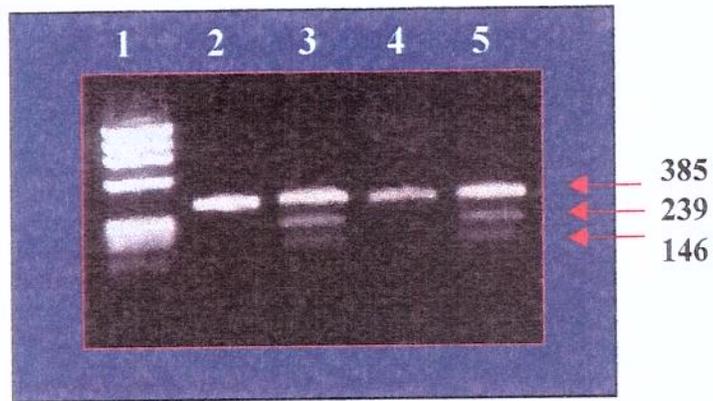


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos digeridos com enzima *Hinf* I (5' gene β). 1, marcador ϕ X174 RF DNA/Hae III (**Gibco Brl**), 2, fragmento amplificado (sem digestão), 3, paciente heterozigoto (-/+), 4, paciente homozigoto (-/-), 5, paciente heterozigoto (-/+).

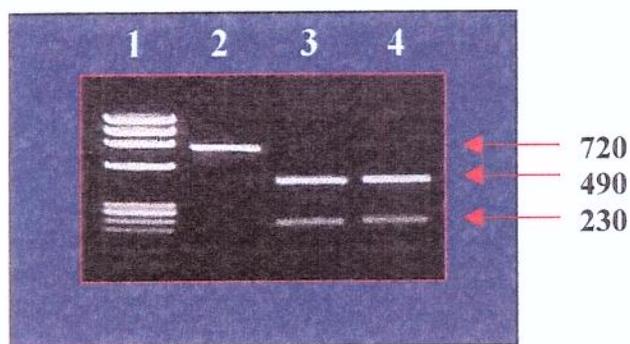


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos digeridos com enzima *Ava* II (IVS II gene β). 1, marcador ϕ X174 RF DNA/Hae III (**Gibco Brl**), 2, fragmento amplificado (sem digestão), 3 e 4, pacientes homozigotos (+/+). Esse sítio polimórfico esta presente em todos os haplótipos clássicos.

2. RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DO SSCP NÃO RADIOATIVO

Analisamos 5 regiões de cada um dos 13 haplótipos atípicos selecionados. O objetivo na escolha dessas regiões foi caracterizar os haplótipos em regiões onde não existem sítios de restrição para análise por RFLP. A técnica foi inicialmente padronizada com 10 pacientes controle, incluindo homocigotos para haplótipo Bantu, homocigotos para haplótipo Benin e heterocigotos para Bantu/Benin. Além disso, para cada uma das regiões analisadas, foram colocados um controle de haplótipo homocigoto para Bantu, Benin e um heterocigoto Bantu/Benin. Logo abaixo as figuras 11, 12, 13, 14 e 15 mostram os padrões dos pacientes controles encontrados em cada uma das regiões. Os resultados dos pacientes estão descritos na tabela 8.

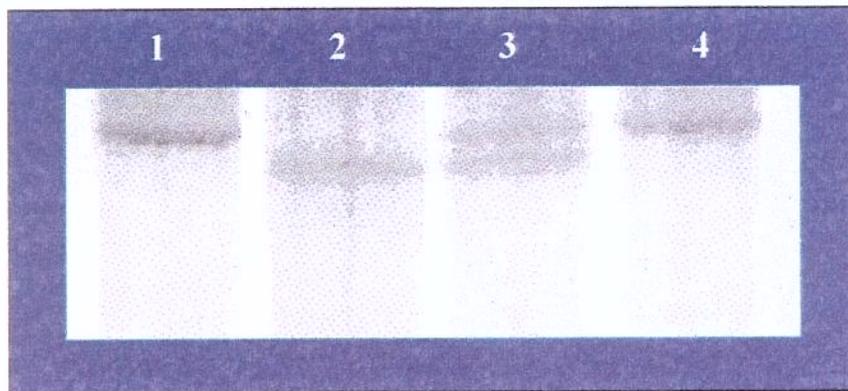


Figura 11. Região 10523S/11184AS. 1, paciente controle Bantu/Bantu, 2, paciente controle Benin/Benin, 3, paciente controle Bantu/Benin, 4, paciente homocigoto Bantu/Bantu.

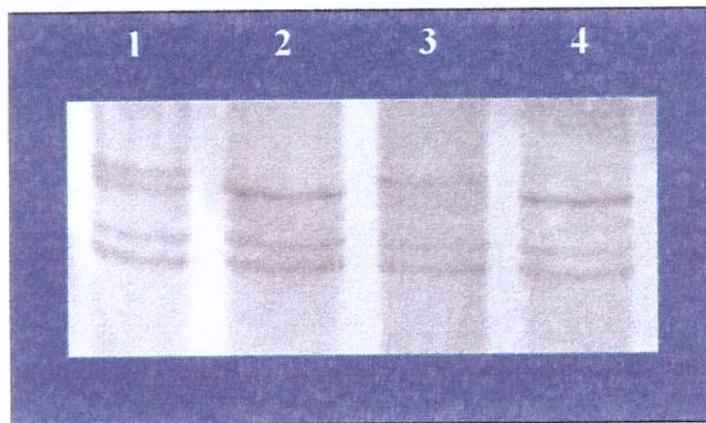


Figura 12. Região 16460S/17000AS. 1, paciente controle Benin/Bantu, 2, paciente controle Bantu/Bantu, 3, paciente controle Benin/Benin, 4, paciente homozigoto Bantu/Bantu.

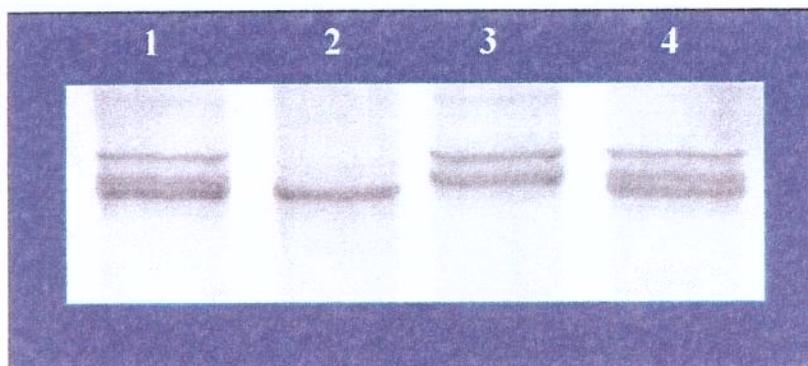


Figura 13. Região 17959S/18540AS. 1, paciente controle Benin/Bantu, 2, paciente controle Bantu/Bantu, 3, paciente controle Benin/Benin, 4, paciente heterozigoto Benin/Bantu.

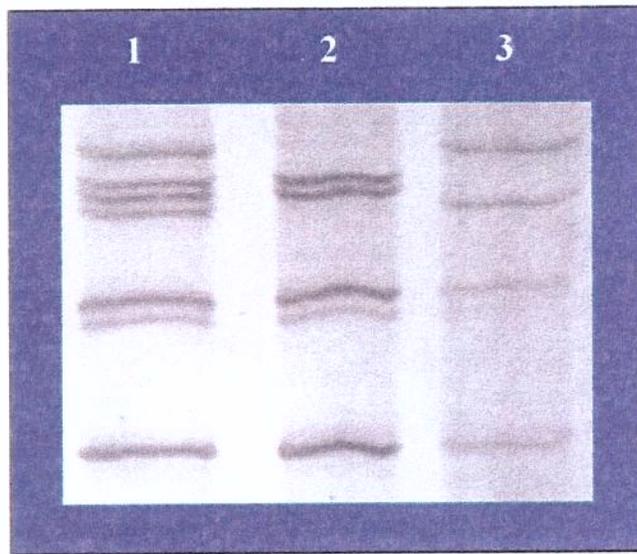


Figura 14. Região 61350S/61889AS. 1, paciente controle Benin/Bantu, 2, paciente controle Bantu/Bantu, 3, paciente controle Benin/Benin.

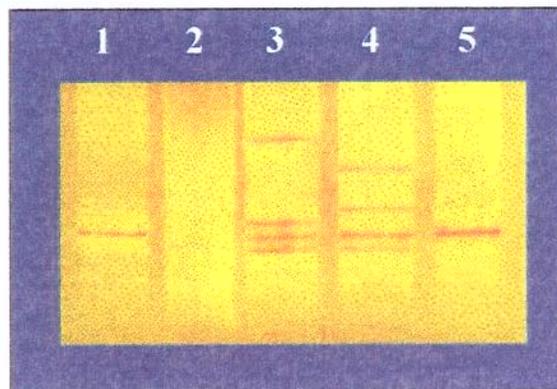


Figura 15. Região HS3². Gel de SSCP corado com nitrato de prata, cuja figura foi capturada na cor original para ilustração. 1, paciente controle Bantu/Bantu, 2, paciente controle Benin/Benin, 3, paciente controle Bantu/Benin, 4, controle normal (ausência da globina S), 5, paciente Bantu/Bantu.

Tabela 8. Resultados de SSCP não radioativo das 5 regiões analisadas em 13 haplótipos atípicos

PACIENTES	REGIÃO 1	REGIÃO 2	REGIÃO 3	REGIÃO 4	REGIÃO 5
	LCR-ε	LCR-ε	LCR-ε	5'β	HS3'
	(10523/11184)	(16460/17000)	(17959/18539)	(61350/61889)	
Família 18A	Ben/Bantu	Ben/Bantu	Ben/Bantu	Ben/Bantu	Ben/Bantu
82A	Bantu/Bantu	Bantu/Bantu	Bantu/Bantu	Bantu/Senegal	Bantu/Bantu ou Senegal**
0175/5146*	Bantu/Bantu	Bantu/Bantu	Bantu/Bantu	Bantu/Bantu	Bantu/Bantu
81A/32A	Bantu/Bantu	Bantu /Ben	Bantu /Ben	Bantu /Ben	Bantu /Ben
28A	Bantu/Bantu	Bantu/Bantu	Bantu/Bantu	Bantu/ND	Bantu/Bantu
83A	Bantu/Bantu	Bantu/Bantu	Bantu/Bantu	Bantu/Bantu	Bantu/Bantu
5A	Bantu/Bantu	Bantu/Bantu	Bantu/Bantu	Bantu/Bantu	Bantu/Bantu

* estes pacientes possuem apenas um sítio de RFLP em discordância com haplótipo típico Bantu

** não houve um controle de haplótipo Senegal, portanto não podemos afirmar que haplótipos Bantu e Senegal tenham padrões polimórficos diferentes nesta região.

ND = não determinado

3. RESULTADOS DA ANÁLISE DAS REGIÕES MICROSATÉLITES POR PCR RADIOATIVO

Inicialmente, foram feitas análises de 10 pacientes controle com haplótipos homozigotos Bantu, Benin e heterozigotos Bantu/Benin. Com base nos resultados, pudemos concluir que estas regiões são haplótipo específicas. Abaixo seguem descritos nas figuras 16, 17 e 18 os padrões dos pacientes controles e de alguns pacientes em estudo nas 3 regiões analisadas. Os resultados das análises dos pacientes em estudo seguem na tabela 9.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

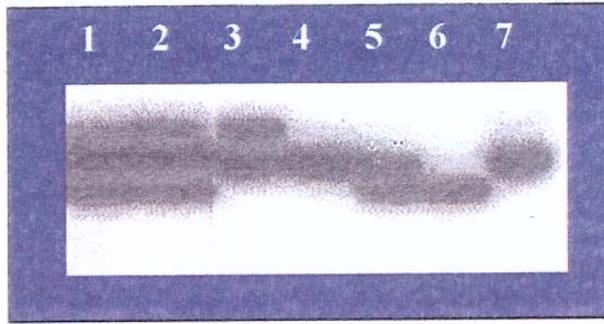


Figura 16. Região HS2-LCR (8805/9029). 1 e 2, são amostras de membros de uma mesma família, cujo padrão é diferente dos controles Bantu e Benin, 3, paciente também com padrão diferente dos controles, 4, paciente homozigoto Bantu/Bantu, 5, paciente controle Bantu/Benin, 6, paciente controle Benin/Benin, 7, paciente controle Bantu/Bantu. O controle Bantu/Bantu corresponde ao genótipo $(AT)_8N(AT)_{11}$, onde $N=ACACATATACGT$ e Benin/Benin corresponde a $(AT)_8N'(AT)_7$, onde $N'=ACACATATACGTGT$ (Oner *et al.*, 1992).

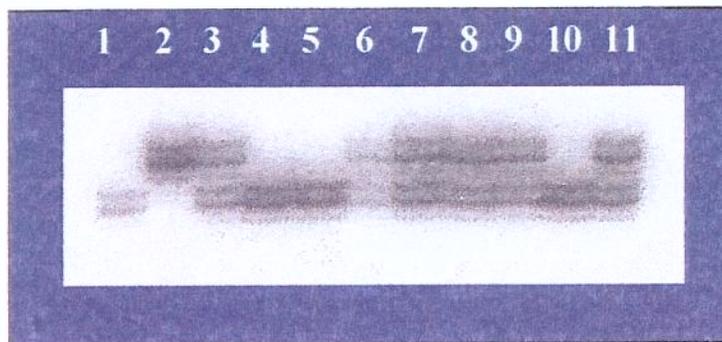


Figura 17. Região entre LCR e o gene ϵ (13169/13329). 1, paciente controle Bantu/Bantu, 2, paciente controle Benin/Benin, 3, paciente controle Bantu/Ben, 4, 5 e 10, pacientes homozigotos Bantu/Bantu, 6, 7, 8, 9 e 11, pacientes heterozigotos Bantu/Benin.

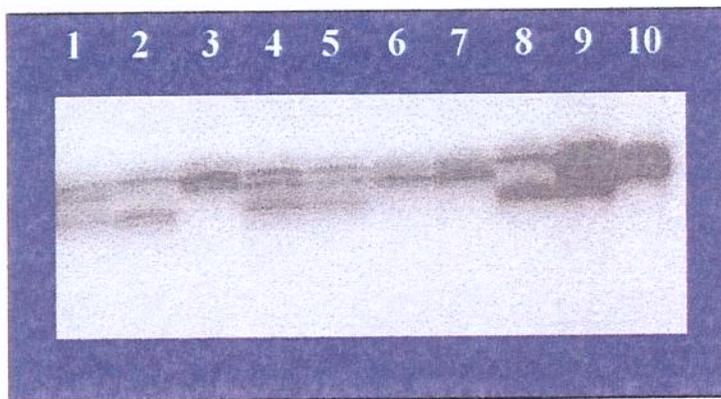


Figura 18. Região localizada no IVS II do gene γ G (35469/35655). 1, paciente Bantu/Benin, 2, paciente Benin/Benin, 3, paciente Bantu/Indeterminado, 4, paciente Bantu/Benin, 5, paciente Bantu/Benin, 6, paciente Bantu/Bantu, 7, paciente Bantu/Bantu, 8, paciente controle homozigoto Benin/Benin, 9, paciente controle heterozigoto Bantu/Benin, 10, paciente controle homozigoto Bantu/Bantu.

Tabela 9. Padrões polimórficos dos pacientes obtidos através do PCR radioativo das 3 regiões analisadas

PACIENTES	LCR-HS2 TA repeat	LCR- ϵ CA repeat	IVS II γ TG repeat
Família 18A	Benin / $(AT)_9N_{10}(AT)_{10}$ *	Benin /Bantu	Benin /Bantu
0175/5146	Bantu/Bantu	Bantu/Bantu	Bantu/Bantu
82A/28A	Bantu/Bantu	Bantu/Bantu	Bantu/Senegal
81A/32A	Bantu/Bantu	Bantu/Benin	Bantu/Benin
83A	Bantu/Bantu	Bantu/Bantu	Bantu /ND
5A	Bantu / $(AT)_9N_{10}(AT)_{10}$ *	Bantu/Bantu	Bantu/ Benin

ND = não determinado

* padrão polimórfico do haplótipo Bantu é $(AT)_8N_{10}(AT)_{11}$ e do haplótipo Benin é $(AT)_8N_{12}(AT)_7$.

4. SEQUENCIAMENTO

Foram sequenciadas 2 regiões do “cluster”: CA repeat (13169/13329) e $(At)xTy$ ($5'\beta$ -61350/61889). O objetivo ao sequenciar a primeira foi caracterizar o número de repetições. Para tanto, foram sequenciados pacientes

controle homozigotos Bantu e Benin. Para o haplótipo controle Bantu obtivemos a seguinte sequência: (TA)₈(CA)₁₀, enquanto que para o haplótipo controle Benin: (TA)₉(CA)₁₂. O sequenciamento desta região está demonstrado na figura 19.

O sequenciamento da região (At)xTy foi interessante por dois motivos: 1. a variação deste segmento é haplótipo específica, portanto as variações encontradas entre os pacientes foram utilizadas na determinação do haplótipo desta região, 2. foi possível comparar resultados entre SSCP não radioativo e sequenciamento, e desta forma confirmar a sensibilidade do primeiro método para análise deste fragmento. As sequências encontradas para cada um dos pacientes estão demonstradas na tabela 10. Os sequenciamentos das regiões descritas acima estão demonstrados nas figuras 19 e 20.

Tabela 10. Polimorfismos da região (AT)_xT_y, localizada a montante do gene β, caracterizados por sequenciamento

PACIENTES	(AT)_xT_y 61595-61615**	POLIMORFISMO CARACTERÍSTICO DE
Normal	(AT) ₇ T ₇	Referência
Controle	(AT) ₈ T ₄	Senegal
Controle	(AT) ₈ T ₄	Benin
Controle	(AT) ₆ T ₉	Bantu
28A	1. (AT) ₇ T ₇ 2. (AT) ₆ T ₉	Bantu/Referência*
83A/5A	Homozigoto - (AT) ₆ T ₉	Bantu/Bantu
Família 18A N=5	1. (AT) ₆ T ₉ 2. (AT) ₈ T ₄	Benin /Bantu
0175/5146	Homozigoto - (AT) ₆ T ₉	Bantu/Bantu
81A/32A	1. (AT) ₆ T ₉ 2. (AT) ₈ T ₄	Bantu/Benin
82A	1. (AT) ₆ T ₉ 2. (AT) ₈ T ₄	Bantu/Senegal

* o padrão (AT)_xT_y encontrado em um dos alelos foi semelhante à referência encontrada no GenBank.

** posições determinadas segundo coordenadas do Genbank

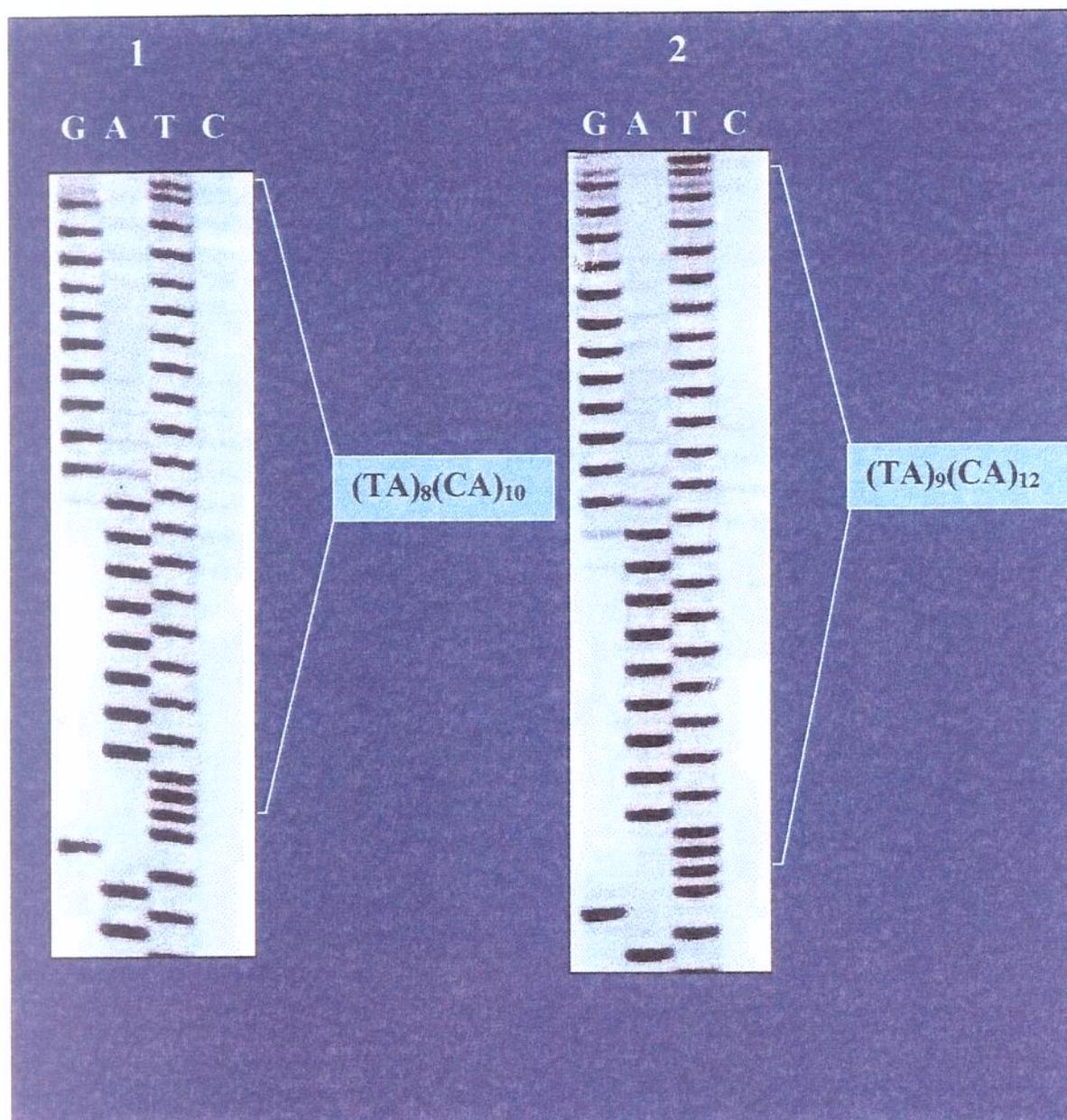


Fig 19. Sequenciamento da região presente entre o LCR e o gene ϵ ((13169/13329). 1, sequenciamento de um paciente controle homocigoto para haplótipo Bantu, 2, sequenciamento de paciente controle homocigoto para haplótipo Benin.

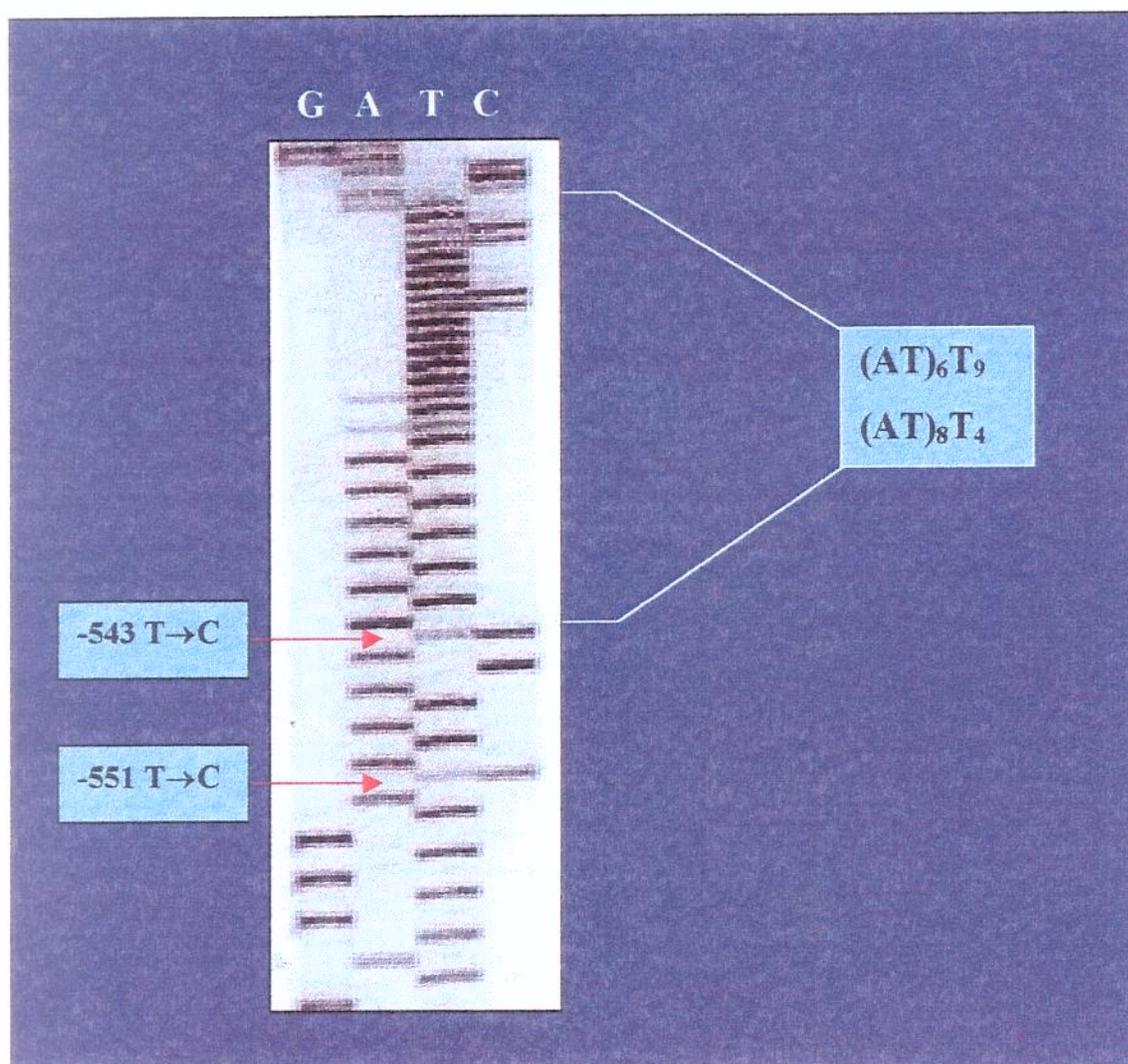


Fig 20. Sequenciamento da região (AT)_xT_y, localizada 5' do gene beta (61350/61889). Paciente heterozigoto para haplótipos Bantu/Benin. Na posição -543 o nucleotídeo T é característico do haplótipo Benin, enquanto que C é característico de Bantu. Na posição -551, T é característico de Benin enquanto que C é característico de haplótipo Bantu.

A síntese dos resultados obtidos dentre todos os experimentos realizados se encontra demonstrada na tabela 11.

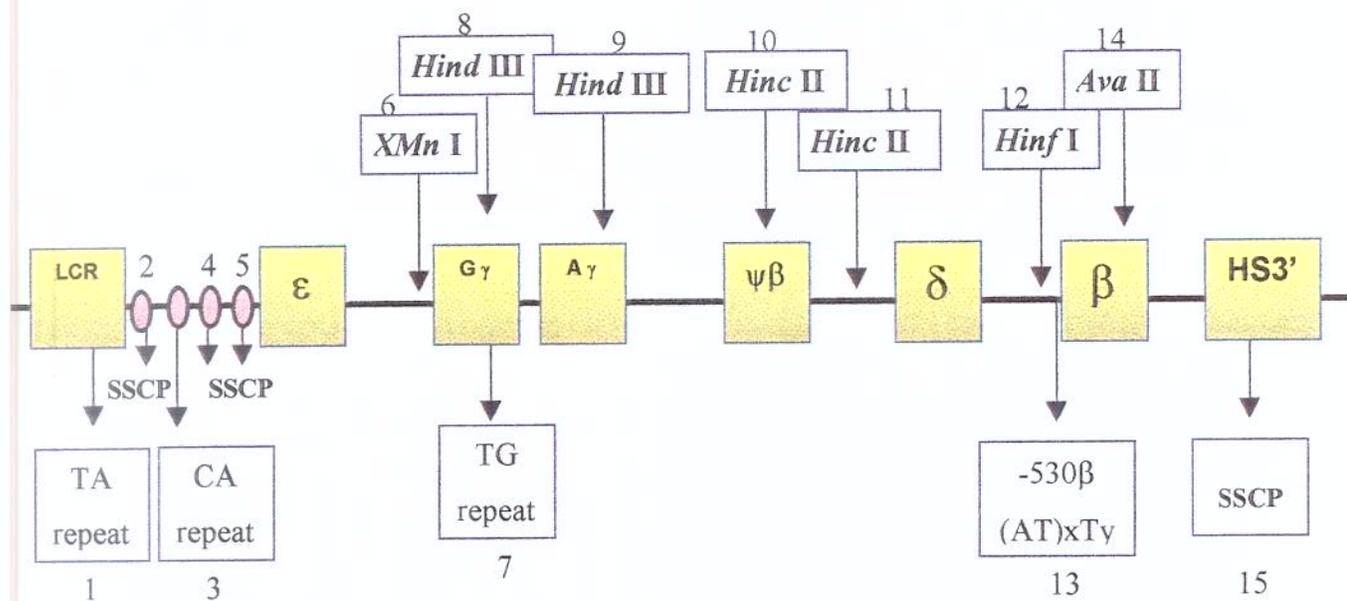


Tabela 11. Padrões dos alelos atípicos encontrados nas 15 regiões analisadas

Pacientes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Familia-5	I	Ba	Ba	Ba	Ba	-	Ba	+	-	-	-	-	Ba	+	Ba
28A	Ba	Ba	Ba	Ba	Ba	+	Se	+	-	+	+	+	I	+	Ba
82A	Ba	Ba	Ba	Ba	Ba	+	Se	+	-	+	+	+	Se	+	Se
83A	Ba	Ba	Ba	Ba	Ba	-	I	-	-	-	+	+	Ba	+	Ba
5A	I	Ba	Ba	Ba	Ba	-	Be	-	-	-	+	+	Ba	+	Ba
0175/5146	Ba	Ba	Ba	Ba	Ba	-	Ba	+	+	-	-	-	Ba	+	Ba
81A/32A	Ba	Ba	Be	Be	Be	-	Be	-	-	-	+	-	Be	+	Be

Ba = Bantu, Be = Benin, Se = Senegal, I = indeterminado, + = ocorreu digestão, - = não ocorreu digestão.

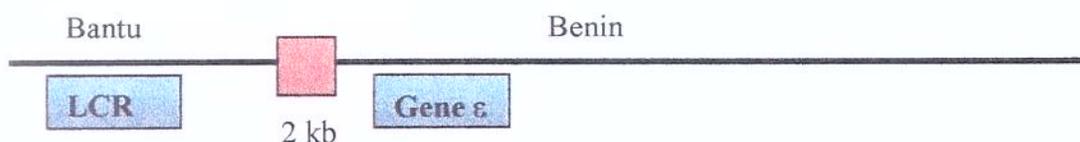
Dentre os 13 pacientes com haplótipos atípicos analisados caracterizamos 7 padrões diferentes que estão demonstrados a seguir:

Padrão 1.



Este padrão de recombinação foi encontrado em 5 pacientes de uma mesma família (18A, 36A, 40A, 76A, 88A), sendo quatro irmãs e uma sobrinha. O ponto de recombinação se encontra dentro de 1,5 kb (coordenadas do GenBank 9030 a 10523), distância esta que representa o ponto onde ocorreu mudança de haplótipo. A sequência indeterminada, presente no HS2, foi posteriormente sequenciada e o resultado foi $(AT)_9N_{10}(AT)_{10}$. Essas variáveis não são comuns a nenhum dos haplótipos classicamente descritos.

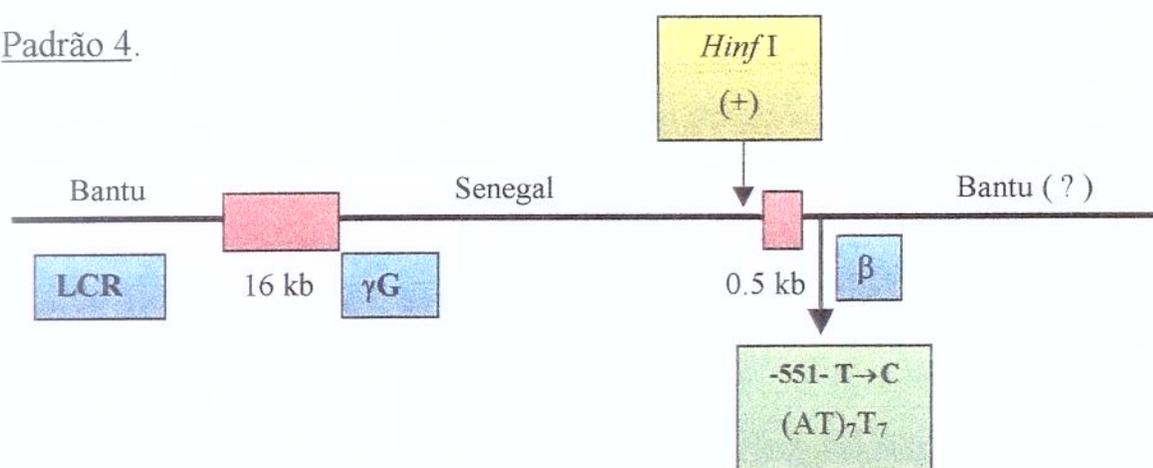
Padrão 2.



Este padrão foi encontrado em 2 pacientes irmãs (81A e 32A). O ponto de recombinação está dentro de uma região que compreende 2 kb (coordenadas 11184 a 13169), distância determinada através de duas regiões analisadas, onde o haplótipo deixa de ser Bantu (LCR) e passa a ser Benin (5' gene ϵ).

Padrão 3.

Este padrão foi encontrado em 2 pacientes não relacionados (0175 e 5146). Na análise global foi detectado somente um sítio polimórfico de restrição discrepante do haplótipo Bantu típico. Este sítio polimórfico está localizado no intron II do gene γA (posição 35767).

Padrão 4.

Este padrão foi encontrado apenas em 1 paciente (28A). Há um intervalo de 16 kb onde ocorre mudança no haplótipo. Essa medida foi determinada pela distância que separa a sequência (17959/18539) analisada por SSCP não radioativo e o primeiro sítio de restrição analisado (5' γG - *Xmn* I). Neste sítio o padrão polimórfico foi heterozigoto -/+. A presença deste sítio é característica do haplótipo Senegal (Embury *et al.*, 1994). Além dessa, há uma segunda região de quebra. Essa região compreende 0,5 kb e está localizada entre o sítio de restrição presente na porção 5' do gene β , reconhecido pela enzima *Hinf* I (posição 61145), cuja presença também caracteriza o haplótipo

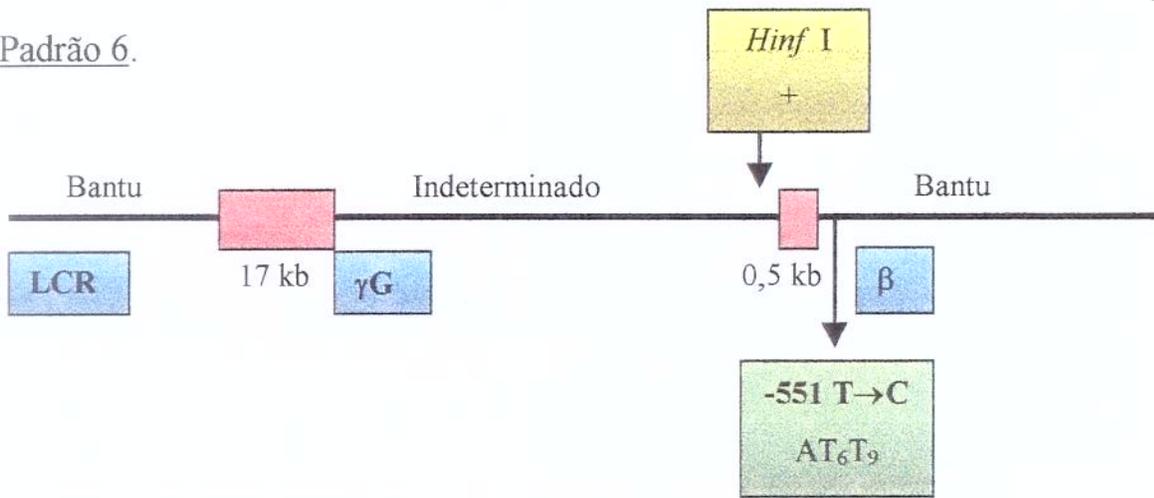
Senegal, e o polimorfismo na posição -551 (posição 61586). No sequenciamento da região -530β , que inclui o polimorfismo na posição -551 (nucleotídeo C para o haplótipo Bantu e T para os demais haplótipos clássicos), foi detectado C em homozigose. Além disso, na região de repetição $(AT)_X T_Y$, foi encontrado um padrão heterozigoto: $AT_6 T_9$ (característico de Bantu)/ $AT_7 T_7$. Na análise do HS3' foi detectado um padrão Bantu em homozigose.

Padrão 5.



Este padrão foi encontrado em apenas um paciente (82A). A região de recombinação compreende 16 kb, indo desde a posição 18539, analisada por SSCP não radioativo, o qual resultou no padrão homozigoto Bantu/Bantu, até o primeiro sítio de restrição analisado. A presença desse sítio ($5' \gamma^G - X M n I$), juntamente com o sequenciamento da região -530β , o qual revelou padrão $(AT)_8 T_4$ e ainda, o polimorfismo na posição -521 ($C \rightarrow T$), cujo nucleotídeo T é característico do haplótipo Senegal, revelaram que pode tratar-se de um híbrido Bantu/Senegal.

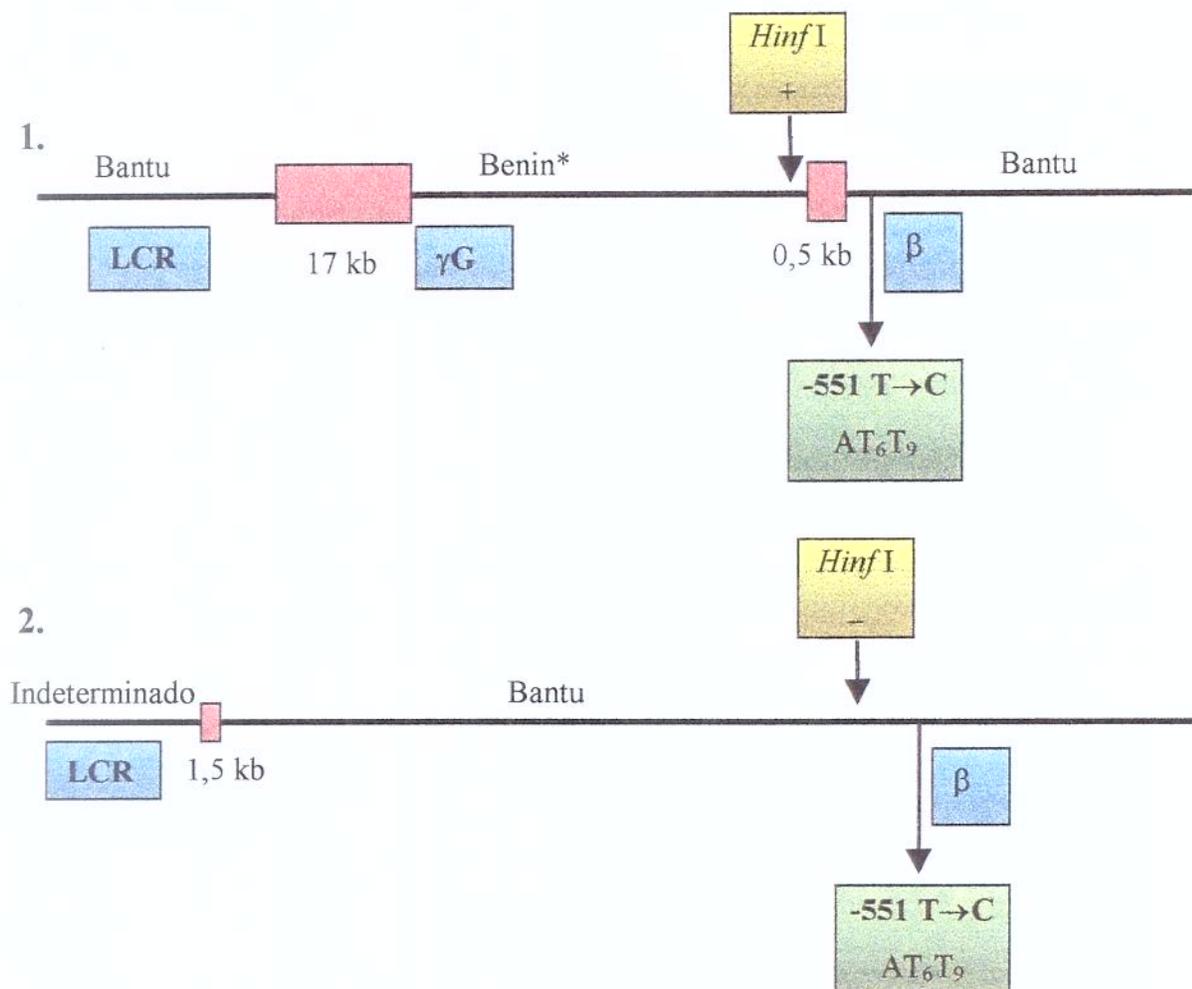
Padrão 6.



Este padrão foi encontrado no paciente 83A. O alelo apresentou 2 recombinações. A primeira se encontra em uma região de 17 kb que vai desde a posição 18539, cujo haplótipo foi caracterizado Bantu, até a sequência microsatélite de repetição TG, localizada na posição 35469, cujo haplótipo foi considerado indeterminado. O segundo ponto de recombinação está localizado entre o sítio de *Hinf I* (posição 61145), o qual esteve presente neste alelo, e o polimorfismo **-551 T→C** (posição 61586), característico do haplótipo Bantu, que foi detectado em homozigose.

Padrão 7.

Este paciente (5A) apresentou os dois alelos atípicos. Os padrões de cada um deles estão demonstrados abaixo.



O estudo desse paciente foi realizado pela análise de três membros disponíveis da família. Os mesmos experimentos foram feitos com 2 irmãos e o pai, um deles e o pai são heterozigotos para o gene β^S e o outro irmão é homozigoto normal. O alelo 1 é comum ao pai e ao paciente em estudo. Em relação ao alelo 1, foi detectado um ponto de quebra em uma região que compreende 17 kb, indo desde a posição 18539 (analisada por SSCP não radioativo), onde foi

caracterizado o haplótipo Bantu, até a posição 35469 (analisada por PCR radioativo), onde foi caracterizado o haplótipo Benin*. A análise por RFLP, exceto pelo sítio de *Hinf* I, juntamente com o PCR radioativo da região localizada no intron II do gene γ G, revelaram um haplótipo “central” característico de Benin. Além deste, ainda um segundo ponto de quebra foi localizado em uma região de 0,5 kb entre o sítio de restrição reconhecido pela enzima *Hinf* I (61145), até a posição 61586, onde se encontra o polimorfismo T→C (-551 do gene β), polimorfismo esse presente em homozigose. Adicionalmente, através do sequenciamento, foi também caracterizada a região (AT) x Ty, com as variáveis X=6 e Y=9, em homozigose, características do haplótipo Bantu. Quanto ao alelo 2, foi possível detectar um ponto de quebra dentro de uma região de 1,5 kb, localizada entre o LCR e o gene ϵ . Essa distância foi estabelecida pela análise do HS2-LCR (através do PCR radioativo), cujo haplótipo foi classificado como indeterminado, e pela análise da sequência 10523/11184 (através do SSCP não radioativo), onde foi caracterizado o haplótipo Bantu. A sequência indeterminada, presente no HS2, foi posteriormente sequenciada e o resultado foi (AT) $_9$ N $_{10}$ (AT) $_{10}$, variáveis não semelhantes a nenhum dos haplótipos clássicos. As demais sequências analisadas foram todas semelhantes ao haplótipo Bantu.

A análise dos haplótipos atípicos dos 13 pacientes detectou 7 padrões diferentes. Em todos esses padrões foi encontrado um ponto de recombinação entre o LCR e o gene ϵ . Desses, 3 padrões apresentaram apenas uma quebra (padrões 1, 2 e 5). Adicionalmente, em 3 padrões foram detectados mais de um ponto de quebra (padrões 4, 6 e 7). Um localizado entre LCR e o gene ϵ e o segundo localizado entre os genes δ e β . Além disso, encontramos 2 pacientes onde o haplótipo atípico diferiu do típico exclusivamente por um sítio polimórfico de restrição (padrão 3).

DISCUSSÃO

A caracterização dos haplótipos do complexo do gene da globina beta, na anemia falciforme, representa importante contribuição à análise das origens dessa anormalidade, além de fornecer dados sobre sua heterogênea apresentação clínica (Sutton *et al.*, 1989; Powars, 1991).

O estudo inicial dos haplótipos derivou quase que exclusivamente da identificação de RFLPs nas vizinhanças do gene beta. A ampliação desse estudo para regiões mais distantes desse gene resultou em novos dados e tornou possível a caracterização de novos padrões de haplótipos (haplótipos ampliados – “extended haplotypes”) (Périchon *et al.*, 1993; Gonçalves *et al.*, 1994).

Haplótipos atípicos em anemia falciforme geralmente resultam de recombinação entre haplótipos comuns em anemia falciforme e haplótipos raramente associados com o gene da globina β^s (Steinberg *et al.*, 1998). Recombinação genética é um processo que vem sendo estudado há muitas décadas. A identificação das bases molecular deste processo é em geral trabalhosa pela alta complexidade dos genomas humanos. Uma das regiões favoráveis para esta análise detalhada é o complexo do gene da globina beta humana. Dentro de uma região de 63 kb existem pelo menos 17 sítios polimórficos reconhecidos por enzimas de restrição (Gerhard *et al.*, 1984). Esses 63 kb estão subdivididos em uma extensão de 34 kb 5' ao gene β , 19 kb 3' ao gene β e 9 kb no domínio central. Essas extensões 5' e 3', presentes no complexo da globina β , são denominadas “subclusters”. Análise genética da população mostrou que enquanto os sítios polimórficos dentro de cada “subcluster” (5' e 3') mostram um forte desequilíbrio de ligação entre si, não

há desequilíbrio de ligação entre estes dois “subclusters” e os sítios polimórficos dentro da região de 9kb que os separa (Antonarakis *et al.*, 1982). De fato, uma proporção de recombinação de 3 a 30 vezes maior do que o esperado, foi encontrada neste domínio central. Devido a este fato, esta região de 9 kb é considerada uma região altamente susceptível à recombinação (“hot-spot”), responsável por até 75% dos eventos de recombinação ocorridos no “cluster” inteiro (Antonarakis *et al.*, 1982; Chakravarti *et al.*, 1984).

Mais de 20 diferentes haplótipos atípicos já foram identificados em pacientes com anemia falciforme. Esta diversidade pode ser explicada pelo heterogêneo componente genético, associado ao gene da globina beta S. (Antonarakis *et al.*, 1982). Os haplótipos em pacientes oriundos das regiões africanas, onde há predominância dos haplótipos Senegal e Bantu, apresentam pequena porcentagem de padrões atípicos (< 10%) (Srinivas *et al.*, 1988). A possível origem desses haplótipos atípicos é variável em cada uma das regiões geográficas estudadas (Embury *et al.*, 1994). Na República Central Africana, onde o gene β^S está associado ao haplótipo Bantu, a maioria dos haplótipos atípicos pode ser explicada por eventos de recombinação em uma região localizada 5' ao gene β (Chakravarti *et al.*, 1984). Os poucos haplótipos atípicos, não passíveis de explicação por recombinação, poderiam resultar de mutações de ponto em sequências sensíveis à endonucleases de restrição (Embury *et al.*, 1994). Surpreendentemente, poucos haplótipos atípicos têm sido encontrados em pacientes provenientes da região de Benin. Isto pode ser o resultado da alta frequência de haplótipo do tipo β^S Benin na população normal (60%). Desta forma, muitos eventos de recombinação neste haplótipo não seriam detectáveis (Embury *et al.*, 1994).

Um fator importante a respeito de recombinação genética envolvendo o complexo de genes da globina beta deve ser considerado. Quando a porção 5'

desse complexo (subhaplótipo 5'), incluindo o LCR, se liga por recombinação ao gene da globina β^S , não há formas de se assegurar que os polimorfismos presentes no LCR, ou em qualquer outra região do cromossomo, 5' ao ponto de recombinação, serão os mesmos daqueles ligados ao haplótipo original que sofreu a recombinação. Em alguns haplótipos atípicos é provável que o subhaplótipo 5' seja de origem caucasiana, contribuindo ainda mais para a diversidade genética (Steinberg *et al.*, 1998).

Neste trabalho foram empregados vários procedimentos para determinação dos haplótipos. Alguns deles, como a determinação dos padrões de SSCP não radioativos nas 5 posições descritas e ainda a caracterização da região microsatélite de repetição CA, localizada entre as posições 13169 e 13329, foram estudados pela primeira vez na literatura. Os resultados aqui obtidos demonstraram a grande utilidade da técnica do SSCP na identificação dos polimorfismos. Em relação aos haplótipos β^S existem poucos relatos na literatura onde estas técnicas foram empregadas (Ofori-Acquah *et al.*, 1999).

Considerando os diversos padrões de haplótipos descritos neste trabalho, nos pacientes 0175 e 5146 (padrão 3) a explicação mais provável para seu aparecimento seria uma mutação de ponto no sítio reconhecido pela enzima *Hind* III. Mecanismo similar, envolvendo mutações de ponto em haplótipos Bantu, Benin e Senegal, foi também identificado em outros estudos (Lu and Steinberg, 1996; Zago *et al.*, 2000). Com base nos dados da literatura, podemos considerar este padrão polimórfico como provavelmente sendo Bantu atípico, classificado por alguns autores como tipo A_6 (Embury *et al.*, 1994; Srinivas *et al.*, 1988). Este haplótipo é idêntico ao haplótipo VI de Orkin ($^A\gamma^T$) (Orkin and *et al.*, 1982), relacionado à talassemia beta e comum na região do mediterrâneo (Beldjord *et al.*, 1984).

Para o padrão 4, caracterizado no paciente 28A, onde detectamos um alelo com padrão complexo, provavelmente Bantu/Senegal/Bantu, uma possível explicação seria uma dupla recombinação entre os 2 haplótipos pré-existentes (Bantu X Senegal). Permanece ainda de difícil explicação o padrão $(AT)_7T_7$, detectado através do sequenciamento da região 5' ao gene β , que não é característico do haplótipo Bantu. Uma possível explicação seria uma mutação de ponto T→A na posição -530, que fez com que as variáveis de repetição fossem X=7, Y=7 ao invés de X=6, Y=9. Nesta circunstância, esta paciente poderia apresentar um alelo típico Bantu e um outro recombinante Bantu/Senegal/Bantu, em que existiria uma mutação de ponto.

Quanto ao padrão 5, detectado no paciente 82A, a análise dos sítios polimórficos possibilitou a formulação da hipótese de tratar-se de um híbrido Bantu/Senegal, com uma recombinação localizada entre LCR e o gene ϵ , em uma região de 16 kb.

No padrão 6, apresentado pelo paciente 83A, foi detectado um evento de recombinação que poderia ser explicado por uma conversão gênica. Essa conversão provavelmente teria ocorrido entre um alelo com haplótipo Bantu e um outro alelo não relacionado à mutação β^S , isto é, alelo normal β^A . Desta forma, este segundo alelo “Indeterminado” não teria um padrão característico de nenhum dos haplótipos ligados à anemia falciforme. Padrões semelhantes já foram descritos por outro estudo envolvendo pacientes brasileiros e africanos (Zago *et al.*, 2000). Atualmente a conversão gênica é considerada um dos mais importantes mecanismos responsáveis pela evolução. É definida por um processo de recombinação não recíproca, na qual as sequências interagem de tal forma que uma é convertida na outra (Li and Graur, 1991). Isto transforma uma hélice de DNA de um alelo na sequência do outro alelo

(Li and Graur, 1991; Lewis, 1997). Estudos genéticos mostram que normalmente apenas pequenos fragmentos de DNA sofrem conversão gênica e nestes casos somente parte de um gene é modificada (Alberts *et al.*, 1994).

Em relação ao padrão 7, referente ao paciente 5A, o estudo da família revelou uma interessante e complexa associação de alelos β^S . O paciente possui provavelmente 2 haplótipos atípicos. A análise dos alelos do pai possibilitou a caracterização de um deles, representado pelo padrão Bantu/Benin*/Bantu. Para facilitar a compreensão, um heredograma foi construído e está demonstrado na figura 21.

A análise do pai, heterozigoto para a globina β^S , mostrou que padrão de haplótipo para o alelo que contém essa mutação foi Bantu/Benin*/Bantu. O padrão central observado poderia ser originado de um haplótipo Benin com um sítio polimórfico de restrição discrepante (5' ao gene β - *Hinf* I) ou um padrão que não pertence a nenhum dos haplótipos associados ao gene da globina β^S . Neste caso seria um padrão provavelmente associado ao cromossomo β^A .

No paciente 5A, o padrão detectado em um dos alelos foi caracterizado da mesma forma que o pai, Bantu/Benin*/Bantu. O outro alelo apresentou uma sequência indeterminada na região HS2-LCR. Como o pai apresentou um padrão homozigoto para essa região (Bantu/Bantu), poderíamos considerar a existência de um segundo alelo recombinante, que chamaríamos de Indeterminado/Bantu.

O irmão do paciente era homozigoto para o gene da globina β^A . Analisando a região HS2 desse indivíduo, o padrão encontrado em homozigose foi semelhante ao haplótipo Bantu. Devido a esse dado seria possível concluir que

o alelo materno que contém a mutação β^S é o alelo recombinante detectado no paciente 5A.

Desta forma, uma hipótese provável é que o paciente possua dois alelos com haplótipos atípicos: Bantu/Benin*/Bantu e Indeterminado/Bantu.

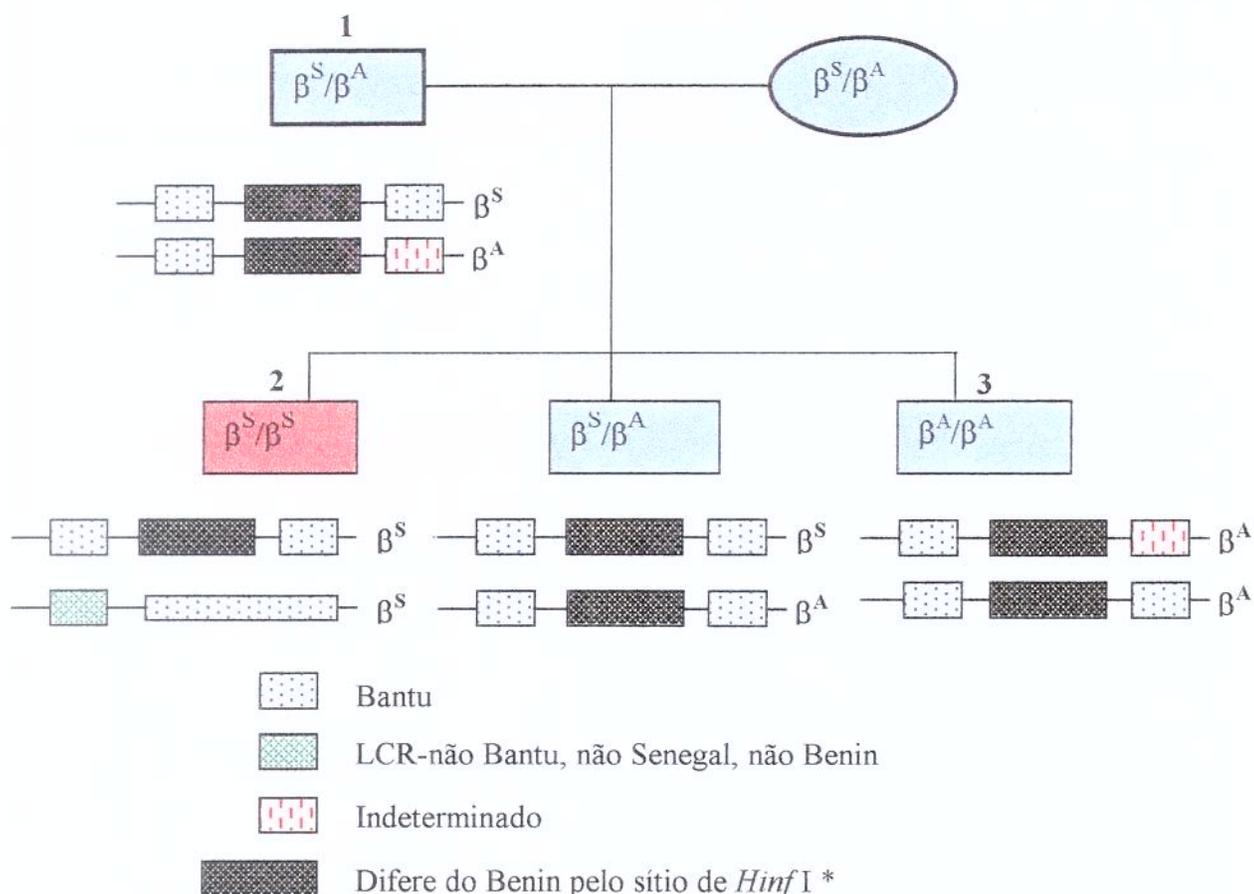


Fig 21. Heredograma da família do paciente 5A. A mãe é falecida e não foi estudada.

* o resultado da análise dos sítios de RFLP, exceto pelo sítio de *Hinf*I, juntamente com a região microsatélite analisada no intron II do gene γ G, demonstraram que provavelmente o haplótipo presente nesta região é Benin.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam estudos anteriores que demonstram a diversidade dos mecanismos responsáveis pela origem dos

haplótipos atípicos associados à anemia falciforme. Os diferentes padrões observados são provavelmente decorrentes de recombinações, mutações de ponto ou conversão gênica entre haplótipos comuns pré-existentes. Dentre os 7 padrões atípicos caracterizados neste estudo, possivelmente originados por recombinação, as regiões de mais frequente recombinação já haviam sido previamente descritas (Lanclos *et al.*, 1991; Ofori-Acquah *et al.*, 1999; Chakravarti *et al.*, 1984; Gerhard *et al.*, 1984; Fullerton *et al.*, 1994) e estão localizadas entre LCR e o gene ϵ e entre o gene δ e o gene β .

Os procedimentos utilizados neste trabalho permitiram caracterizar com maior precisão as regiões dos pontos de quebra presentes entre o LCR e o gene ϵ e entre a região 5' ao gene ϵ e o gene γG . A diferença nos tamanhos destas regiões (1.5 kb, 2 kb, 16 kb e 17 kb) mostram que os eventos de recombinação provavelmente ocorreram em sítios distintos dentro da mesma área. É possível que essa região contenha vários pequenos segmentos, com probabilidade aumentada de sofrerem recombinação, que estão aleatoriamente distribuídos. Isso sugere que este aglomerado de pontos de recombinação estão todos localizados dentro de um mesmo "hot-spot" (Cullen *et al.*, 1997). Um outro local de recombinação foi identificado em uma região de 0.5 kb localizada entre o sítio de restrição reconhecido pela enzima *Hinf* I (posição 61145) e a sequência ATxTy na região 5' ao gene β . A região entre os genes δ e β já fora anteriormente descrita como de elevada susceptibilidade à recombinação (Chakravarti *et al.*, 1984). Nossos resultados permitiram restringir esse ponto de quebra a uma região de 0,5 kb.

Os resultados deste trabalho, tomados em conjunto, contribuem para melhor caracterizar os locais de recombinação no complexo do gene da globina beta e as origens dos haplótipos atípicos na anemia falciforme. Estas observações

suportam os resultados de um estudo recente de diversidade na sequência de alelos do “locus” da globina beta humana. Este estudo reforça a noção de que a recombinação e a conversão gênica na região 5’ ao gene da globina beta têm papel fundamental para a diversidade do haplótipo β^S (Fullerton *et al.*, 1994). A contribuição de elementos ativos em *cis* para o nível de Hb F é fundamental para entender o fenótipo clínico variável da anemia falciforme (Powars *et al.*, 1990; Labie and Elion, 1996). Assim, alelos β^S variantes, que surgem provavelmente por recombinação, e que possuem polimorfismos associados a níveis elevados de Hb F, fornecem a oportunidade de analisar a influência desses elementos nos níveis de Hb F (Ofori-Acquah *et al.*, 1999). Este dado evidencia que estudos do tipo aqui empreendido podem também contribuir para uma possível ação terapêutica na anemia falciforme.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts,B., Bray,D., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K., and Watson,J.D. (1994). **Molecular Biology of the Cell. 3rd edition.** Garland.
- Antonarakis,S.E., Boehm,C.D., Giardinia,P.J.V., and Kazazian,H.H.J. (1982). **Non-random association of polymorphic restriction sites in the beta globin gene cluster.** *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79: 137.
- Baron,M.H. (1997). **Transcriptional control of globin gene switching during vertebrate development.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1351: 51-72.
- Beldjord,C., Arbane,M., Lapoumerouille,C., Rouyer-Fessard,P., Benabadji,M., Labie,D., and Beuzard,Y. (1984). **Linkage between fetal A gamma globin chain polymorphism and DNA polymorphism of the human beta gene cluster in beta thalassemia.** *Mol Biol Med* 2: 301-306.
- Berg,P.E., Mittelman,M., Elion,J., Labie,D., and Schechter,A.N. (1991). **Increase protein binding to a -530 mutation of the human beta globin gene associated with decreased beta globin synthesis.** *American Journal Hematology* 36: 42.
- Bouhassira,E.E., Lachman,H., Krishnamoorthy,R., Labie,D., and Nagel,R.L. (1989). **A gene conversion located 5' to the A gamma gene in linkage disequilibrium with the bantu haplotype in sickle cell anemia.** *J.Clin.Invest.* 83: 2070-2073.
- Boyer,S.H., Belding,T.K., Margolet,L., and Noyes,A.N. (1975). **Fetal hemoglobin restriction to a few erythrocytes (F cells) in normal human adults.** *Science* 188: 361.
- Bungert,J., Dave,U., Lim,K., Lieuw,K., Shavit,J., Liu,Q., and Engel,J.D. (1995). **Synergic regulation of human beta-globin gene switching by locus control region elements HS3 and HS4.** *Genes Dev.*, 9 (24): 3083-3096.
- Chakravarti,A., Buetow,K.H., Antonarakis,S.E., Waber,P.G., Boehm,C.D., and Kazazian,H.H. (1984). **Nonuniform recombination within the human beta globin gene cluster.** *American journal of human genetics* 36: 1239.

- Chehab,F.F., Dohert,M., Cai,S., Kan,Y.W., Cooper,S., and Rubin,E.M. (1987). **Detection of sickle cell anaemia and thalassaemias.** *Nature* **329**: 293.
- Cullen,M., Noble,J., Erlich,H., Thorpe,K., Beck,S., Klitz,W., Trowsdale,J., and Carrington,M. (1997). **Characterization of recombination in the HLA class II region.** *American journal of human genetics* **60**: 397-407.
- Dover,G.J., Smith,K.D., Chang,Y.C., Purvis,S., Mays,A., Meyers,D.A., Sheils,C., and Serjeant,G. (1992). **Fetal hemoglobin levels in sickle cell disease and normal individuals are partially controlled by an X-linked gene located at Xp22.2.** *Blood* **80**: 816-824.
- Driscoll,M.C., Dobkin,C.S., and Alter,B.P. (1989). **Gamma delta beta-thalassaemia due to a de novo mutation deleting the 5'beta-globin gene activation-region hypersensitive sites.** *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **86** (19): 7470-7474.
- Eliou,J., Berg,P.E., Lapoumerouille,C., Trabuchet,G., Mittelman,M., Krishnamoorthy,R., Schechter,A.N., and Labie,D. (1992). **DNA sequence variation in a negative control region 5' to the beta-globin gene correlates with the phenotypic expression of the beta S mutation.** *Blood* **79** (3): 787-792.
- Embury,S.H., Hebbel,R.P., Mohandas,N., and Steinberg,M.H. (1994). **Sickle Cell Disease: Basic Principles and Clinical Practice.** 19-48, 353-380, 279-292. New York, Raven Press, Ltd.
- Emerson,B.M. (1993). **Gene expression: general and cell-type specific.** Karin, M. 116-161. Boston, Birkhauser Boston.
- Flint,J., Harding,R.M., Boyce,A.J., and Clegg,J.B. (1998). **Clinical Haematology: Sickle Cell Disease and Thalassaemia.** (11): 1-52. Bailliere's.
- Fullerton,S.M., Harding,R.M., Boyce,A.J., and Clegg,J.B. (1994). **Molecular and population genetic analysis of allelic sequence diversity at the human beta globin locus.** *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 1805.

- Garner,C., Mitchell,J., Hatzis,T., Reittie,J., Farrall,M., and Thein,S.L. (1998). **Haplotype mapping of a major quantitative-trait locus for fetal hemoglobin production, on chromosome 6q23.** *American journal of human genetics* **62**: 1468-1474.
- Gerhard,D.S., Kidd,K.K., Kidd,J.R., Egeland,J.A., and Housman,D.E. (1984). **Identification of a recent recombination event within the human beta globin gene cluster.** *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **81**: 7875-7879.
- Gonçalves,I., Gonçalves,J., Périchon,B., Osório-Almeida,L., Krishnamoorthy,R., and Lavinha,J. (1994). **A novel mosaic Bantu/Benin/Bantu beta S haplotype found in several Africans populations.** *Human Genetics* **94**: 101-103.
- Hardison,R., Slightom,J.L., Gumucio,D.L., Goodman,M., Stojanovic,N., and Miller,W. (1997). **Locus control regions of mammalian beta globin gene clusters: combining phylogenetic analyses and experimental results to gain functional insights.** *Gene* **205**: 73-94.
- Labie,D. and Elion,J. (1996). **Sequence polymorphisms of potential functional relevance in the beta globin gene locus.** *Hemoglobin* **20** (2): 85-101.
- Lanclos,K.D., Oner,C., Dimovski,A.J., Gu,Y.C., and Huisman,T.H.J. (1991). **Sequence variations in the 5'flanking and IVS-II regions of the G gamma and A gamma globin genes of beta S chromosomes with five different haplotypes.** *Blood* **77** (11): 2488-2496.
- Lapoumerouille,C., Dunda,O., Trabuchet,G., Mony-Lobe,M., Labie,D., Elion,J., and Krishnamoorthy,R. (1989). **A novel sickle gene of yet another origin in Africa: the Cameroon type.** *Blood [suppl 1]* **74**: 63a.
- Lewis,B. (1997). **Genes VI.** 531-560. Oxford University Press.
- Li,Q., Harju,S., and Peterson,K.R. (1999). **Locus control regions: coming of age at a decade plus.** *Trends in Genetics* **15** (10): 403-408.
- Li,W.H. and Graur,D. (1991). **Fundamentals of Molecular Evolution.** 136-169. D. Sinauer Associates, Inc.

- Lu,Z.H. and Steinberg,M.H. (1996). **Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: relation to regulatory sequences cis to the beta globin gene.** *Blood* 87: 1604.
- Nagel,R.L., Fabry,M.E., Pagnier,J., Zohoun,I., Wajcman,H., Baudin,V., and Labie,D. (1985). **Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa.** *The New England Journal of medicine* 312 (14): 880-884.
- Ofori-Acquah,S.F., Lalloz,M.R.A., and Layton,D.M. (1999). **Localisation of cis regulatory elements at the beta globin locus: analysis of hybrid haplotype chromosomes.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 254: 181-187.
- Oner,C., Dimovski,A.J., Altay,Ç., Gurgey,A., Gu,Y.C., Huisman,T.H.J., and Lanclos,K.D. (1992). **Sequence variations in the 5' hypersensitive site-2 of the locus control region of ^S chromosomes are associated with different levels of fetal globin in hemoglobin S homozygotes.** *Blood* 79: 813.
- Orita,M., Iwahana,H., Kanazawa,H., Hayashi,K., and Sekiya,T. (1989). **Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms.** *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (8): 2766-2770.
- Orkin,S.H. and et al (1982). **Linkage of beta thalassemia mutations and beta globin gene polymorphism in human beta globin gene cluster.** *Nature* 296: 627.
- Pagnier,J., Mears,J., Dunda-Belkhodja,O., Schaefer-Rego,K., Beldjord,C., Nagel,R., and Labie,D. (1984). **Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa.** *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81: 1771-1773.
- Périchon,B., Ragusa,A., Lapoumerouille,C., Romand,A., Moi,P., Ikuta,T., Labie,D., Elion,J., and Krishnamoorthy,R. (1993). **Inter-ethnic polymorphism of the beta globin locus control region (LCR) in sickle cell anemia patients.** *Human Genetics* 91: 464-468.
- Pissard,S. and Beuzard,Y. (1994). **A potential regulatory region for the expression of fetal hemoglobin in sickle cell disease.** *Blood* 84: 331.

- Pomerantz,O., Goodwin,A.J., Joyce,T., and Lowrey,C.H. (1998). **Conserved elements containing NF-E2 and tandem GATA binding sites are required for erythroid-specific chromatin structure reorganization within the human beta globin locus control region.** *Nucleic Acids Research* **26** (24): 5684-5691.
- Powars,D., Chan,L.S., and Schroeder,W.A. (1990). **The variable expression of sickle cell disease is genetically determined.** *Semin Hematol* **27**: 360.
- Powars,D. (1991). **Beta S gene cluster haplotypes in sickle cell anemia.** *Hematology/Oncology Clinics of North America* **5** (3): 475-487.
- Ragusa,A., Lombardo,M., Beldjord,C., Ruberto,C., Lombardo,T., Elion,J., Nagel,R.L., and Krishnamoorthy,R. (1992). **Genetic epidemiology of beta-thalassemia in Sicily: do sequences 5' to the G gamma gene and 5' to the beta gene interact to enhance HbF expression in beta-thalassemia?** *American Journal of Hematology* **40** (3): 199-206.
- Sanger,F., Niklen,S., and Coulson,A.R. (1977). **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Smith,R.A., Ho,P.J., Clegg,J.B., Kidd,J.R., and Thein,S.L. (1998). **Recombination breakpoints in the human beta-globin gene cluster.** *Blood* **92** (11): 4415-4421.
- Srinivas,R., Dunda,O., Krishnamoorthy,R., Fabry,M.E., Georges,A., Labie,D., and Nagel,R.L. (1988). **Atypical haplotypes linked to the beta S gene in Africa are likely to be the product of recombination.** *American Journal of Hematology* **29**: 60-62.
- Stamatoyannopoulos,G., Nienhuis,A.W., Marjerus,P.W., and Varmus,H. (1994). **The Molecular Basis of Blood Diseases.** (2): 107-155, 207-256. Philadelphia, PA, W.B. Saunders Co.
- Steinberg,M.H., Lu,Z.H., Nagel,R.L., Venkataramani,S., Milner,P.F., Huey,L., Safaya,S., and Rieder,R.F. (1998). **Hematological effects of atypical and cameroon beta-globin gene haplotypes in adult sickle cell anemia.** *American Journal of Hematology* **59**: 121-126.

- Steinberg,M.H., Hsu,H., Nagel,R.L., Milner,P.F., Adams,J.G., Benjamin,L., Fry,S., Gillette,P., Gilman,J., Josifovska,O., Hellman-Erlingsson,S., Safaya,S., Huey,L., and Rieder,R.F. (1995). **Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia.** *American Journal of Hematology* **48**: 175-181.
- Steinberg,M. (1996). **Modulation of phenotypic diversity of sickle cell anemia.** *Hemoglobin* **20** (1): 1-19.
- Sutton,M., Bouhassira,E.E., and Nagel,R.L. (1989). **Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta like globin gene cluster haplotypes.** *American Journal of Hematology* **32**: 66.
- Windsor,S., Taylor,S.A.M., and Lillicrap,D. (1994). **Multiplex analysis of two intragenic microsatellite repeat polymorphisms in the genetic diagnosis of haemophilia A.** *British Journal of Haematology* **86**: 810-815.
- Zago,M.A., Silva Jr,W.A., Dalle,B., Gualandro,S., Hutz,M.H., Lapoumeroulie,C., Araujo,A.G., Krieger,J.E., Elion,J., and Krishnamoorthy,R. (2000). **Atypical beta S haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms.** *American Journal of Hematology* **63**: 79-84.