

BC/21080
IB/81084

Marilda de Souza Gonçalves

SECRETARIA
D.
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Marilda de Souza
Gonçalves 05
aprovada pela Comissão Julgadora. 71
94



**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DAS
ANORMALIDADES MOLECULARES DA
PERSISTÊNCIA HEREDITÁRIA DA HEMOGLOBINA
FETAL E DA DELTA-BETA TALASSEMIA NO
BRASIL**

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

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

**Campinas
- 1994 -**

T/UNICAMP

G587
C

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	1
	6587-
V.	Ex.
REMOB BC/21	080
PRDG.	286/94
C	D
PRDG.	CR\$ 800,00
DATA	25/02/94
N.º CPD	

2M,000 547 21-0

*A painho, mainha (in memorian)
Aos meninos e ao John*

*Ao Prof. Dr. Fernando F. Costa, pela amizade,
confiança , incentivo, apoio e por ter
proporcionado a realização de um grande
sonho*

Agradecimentos

Aos professores do Departamento de Genética Médica, em especial ao , Prof. Dr. Bernardo Beiguelman , Profa Dra Christine Hackel, Profa. Dra Denise Y. Norato, Profa Dra Denise Cavalcante, Profa. Dra. Antonia Paula Faria, Prof. Dr.. Walter Pinto Junior, Prof Dr. Luís Alberto Magna, Profa. Dra Solange Bento Farah, Profa. Dra Maricilda Palandi Melo.

Ao Prof. Dr. Antonio Sérgio Ramalho e a Pofa Dra Carmen Sílvia Bertuzzo Martins, por tudo.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Genética Médica, em especial ao Paulinhum, ao Henry, à Jô, à Sonia , à Claudinha, ao Roberto, ao Carlos, ao Toninho, à Mada, a Isa e a Edi, por terem sido a minha grande família em Campinas.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro: Tereza, Maria Helena, Dil, Carlito, Robertinho, Simone, Patricia , Moniquinha , Silvana e Maristela.

Às Profas. Dra Sara T. O. Saad, Dra Helena Grotto e Dra Maria de Fátima Sonati

Aos irmãos, Carmen, Aranha, Valder, Regina, Afonso e Márcia, por todo carinho e amizade.

À Malu, pela paciência e grande ajuda no ajuste final deste trabalho.

À Elzinha e à Eumiria, pela grande ajuda (Laboratório de Hematologia do Departamento de Patologia Clínica).

Ao Dr. Terrance A. Stoming e família.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Medical College of Georgia.

À UFBA, em especial à Dra. Elza Andrade de Carvalho, ao Dr. Roberto Silva Muniz, ao Dr. Dilson Fernandez, à Dra. Angela Pontes de Carvalho e à Profa. Dra Eliane Silva Azevedo.

A todos os docentes da Disciplina de Hematologia da FCM/UNICAMP e aos funcionários do HEMOCAMP.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Índice

1. Introdução	1
- A Hemoglobina	2
-Os genes da Globina	5
-Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal	14
- por deficiência gênica	16
-por mutação de ponto	19
-Talassemias delta-beta	24
2. Objetivos	32
3. Casuística e Métodos	34
4. Resultados	57
5. Discussão	115
6. Conclusões	126
7. Resumo	128
8. Summary	131
9. Referências Bibliográficas	133

INTRODUÇÃO

A Hemoglobina

As hemoglobinas humanas compreendem um grupo de moléculas com estrutura e propriedades funcionais similares, cuja principal função é o transporte de oxigênio para os tecidos. Cada molécula possui um peso molecular de aproximadamente 64.000 Daltons e formato elíptico com dimensões de 64X55X50 Angströms. A molécula da hemoglobina é composta por quatro sub-unidades, cada uma contendo uma porção protéica denominada globina e um grupo heme que é constituído por um complexo ferro-porfirina. Os átomos de ferro no grupo heme constituem o sítio de ligação do oxigênio, e cada molécula é capaz de combinar-se com quatro moléculas de oxigênio (Bunn & Forget, 1986).

As hemoglobinas humanas são genericamente constituídas de duas cadeias ou sub-unidades do tipo alfa (α) e duas cadeias do tipo não- α . As globinas pertencentes a família α incluem as cadeias α e zeta (ζ) ao passo que aquelas pertencentes a família não- α incluem as cadeias beta (β), gama (γ), delta (δ) e épsilon (ϵ). As cadeias γ são classificadas em γ^G e γ^A de acordo com a presença de um resíduo Glicil ou Alanil na posição 136 da cadeia protéica (Schroeder *et al*, 1968). A cadeia γ^A possui um sítio polimórfico na posição 75, que pode ser ocupada por uma Isoleucina (I_{γ^A}) ou uma Treonina (T_{γ^A}) (Efremov *et al*, 1979; Saglio *et al*, 1979).

No desenvolvimento ontogênico humano sete tipos diferentes de cadeias de globina são sintetizados: α , ζ , ϵ , γ^G , γ^A , δ e β . O ritmo de síntese de cada uma das cadeias da globina varia consideravelmente durante os períodos pré e pós-natal. A cadeia ζ é sintetizada logo no início da vida embrionária e é rapidamente substituída pela síntese da cadeia α . A primeira das globinas complementares não- α a ser detectada é a cadeia ϵ nos primeiros meses após a concepção sendo rapidamente substituída pelas cadeias γ (Pataryas & Stamatoyannopoulos, 1972). A síntese de cadeias β tem início nos segundo ou terceiro meses de vida intrauterina e logo após o nascimento substitui completamente a síntese das cadeias γ (*switching*) que após os 6 meses representam

menos que 10% do total da globina não- α . A produção de cadeias δ tem início após o nascimento mas nunca atinge em condições normais níveis superiores a 3% do total. Desse modo são encontradas durante todo esse período as seguintes hemoglobinas, Hb Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Hb Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$), Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$), Hb Fetal (HbF)($\alpha_2\gamma_2$), Hb A₁ ($\alpha_2\beta_2$) e Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$). Além da redução na síntese das cadeias $\gamma^G + \gamma^A$ após o nascimento, outra importante alteração é observada nas proporções dessas duas cadeias, a relação γ^G e γ^A de 7:3 passa a 4:6, sendo que os valores normais para a HbF na vida adulta situam-se entre 0,3 a 1,2% (Colombo *et al*, 1976; Hecht *et al*, 1966; Horton *et al*, 1962; Huehns *et al*, 1964; Kazazian & Woodhead, 1973; Pataryas & Stamatoyannopoulos, 1972; Weatherall & Clegg, 1981).

Os genes da Globina

Os genes das cadeias ζ e α estão localizados no braço curto do cromossomo 16 (Deisseroth *et al*, 1976, 1977, 1978). O gene ζ funcional somente é ativo durante a vida embrionária e dois genes inativos ou pseudogenes ($\psi\zeta$ e $\psi\alpha$) estão localizados entre o gene ζ e os dois genes α compreendendo aproximadamente 30 Kilobases (Kb). O grupo de genes ϵ - γ^G - γ^A - $\psi\beta$ - δ - β está localizado no braço curto do cromossomo 11 abrangendo uma região de aproximadamente 55Kb. Com exceção do gene $\psi\beta$, todos os genes são ativos em algum período do desenvolvimento ontogênico. O gene ϵ é ativo durante a vida embrionária, os dois genes γ são ativos principalmente durante a vida fetal e os genes δ e β têm a sua maior atividade após o nascimento.

O enorme desenvolvimento de técnicas no campo da biologia molecular tornou possível a construção de mapas detalhados do grupo de genes β . Estes mapas mostram que os genes estão arranjados na ordem 5'- ϵ - γ^G - γ^A - δ - β -3', e que a distância entre os genes γ^G e γ^A é de 3,5 Kb, entre os genes γ^A e δ é de 14 Kb, e de 5,4 Kb entre os genes δ e β (Fritsch *et al*, 1980). Um aspecto importante quanto a organização dos genes no cromossomo é que eles estão localizados na mesma ordem em que ocorre a sua expressão durante o desenvolvimento. O gene ϵ embrionário localiza-se na posição 5' seguido imediatamente pelos genes γ que são predominantemente sintetizados na vida fetal, os quais finalmente são substituídos pelos genes da vida adulta, o δ e o β . Este arranjo peculiar levou à suposição de que sequências regulatórias poderiam estar presentes nas regiões intergênicas e que programariam o controle da expressão consecutiva de cada gene do grupo, durante o período embrionário, fetal e adulto (Figura 1).

A região codificadora dos genes da globina humana, como ocorre na maioria dos genes de organismos eucarióticos, é interrompida em duas posições, por *Introns* (*IVS* ou *Intervening Sequence*), os quais separam esta região em três *Exons*. Nos genes não- α , as sequências são interrompidas entre os *codons* 30 e 31 e entre os *codons* 104

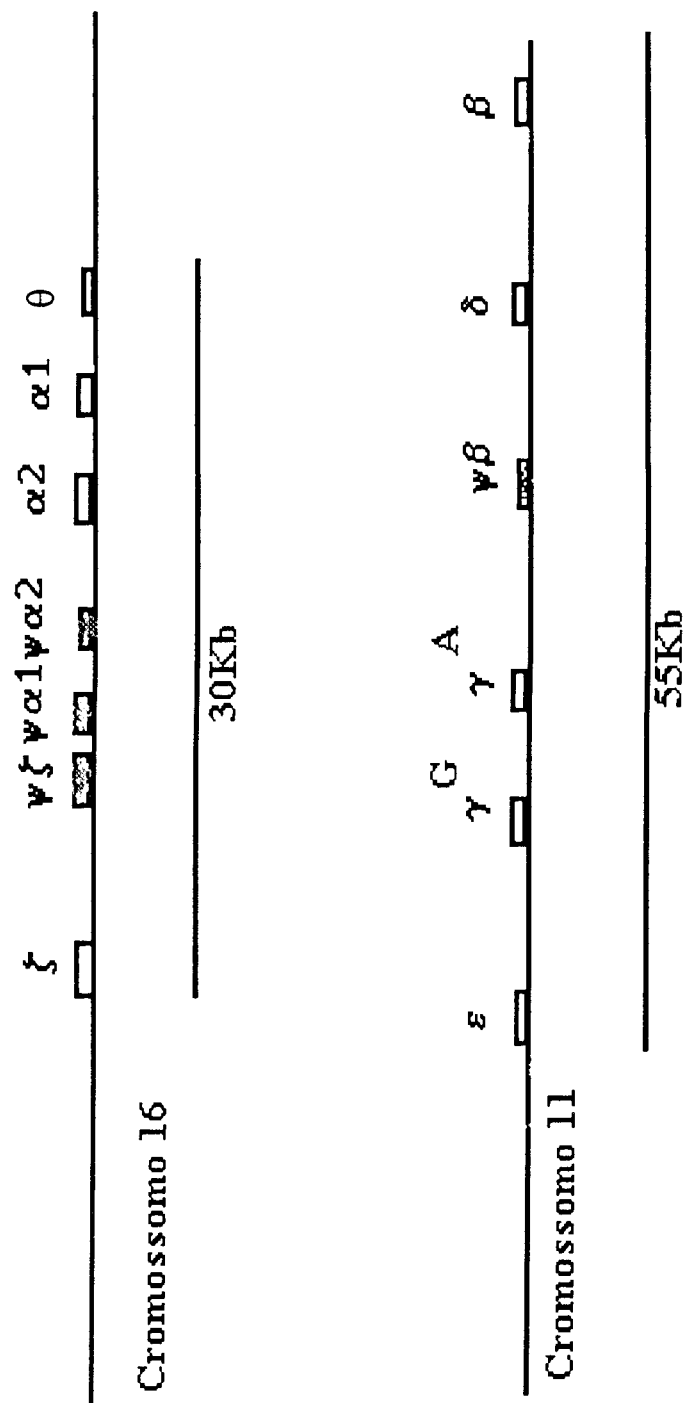


Figura 1. Distribuição dos genes do grupo α e não- α nos cromossomos 11 e 16.

e 105. No grupo da globina α as sequências interrompem-se entre os *codons* 31 e 32 e 99 e 100 . É importante ressaltar que esta descoberta foi realizada independentemente por Tilghman *et al* (1977) nos EEUU e por Jeffreys & Flavell (1977) na Inglaterra. Finalmente, em 1978, Leder *et al* determinaram através de estudos em camundongos, que os genes α e β incluem três blocos de exons separados por dois introns. Um padrão de organização similar ao encontrado por Leder (1978) foi confirmado para os genes da globina humana (Baralle *et al*, 1980; Lauer *et al*, 1980; Lawn *et al*, 1978 e 1980; Leibhaber *et al*, 1980; Proudfoot & Maniattis, 1980; Proudfoot *et al*, 1982; Slightom *et al*, 1980; Spritz *et al*, 1980) .

O estudo das regiões de DNA (Ácido Desoxirribonucleico) adjacentes às regiões codificantes dos genes da globina assim como de outros genes de organismos eucarióticos tem identificado numerosas sequências altamente conservadas durante a evolução e que representam elementos importantes para a transcrição (Efstradiadis *et al*, 1980). Desta forma, em todos os genes da globina, dinucleotídeos GT e AG aparecem respectivamente nos finais das posições 5' e 3' dos *introns*, constituindo sequências de DNA necessárias para a remoção precisa dos *introns* durante a transcrição (*splicing*).

A região promotora localizada na porção 5' da região codificante apresenta características interessantes, e são observadas várias sequências de nucleotídeos que aparentemente estão envolvidas no controle da transcrição e são relativamente conservadas durante a evolução.

A primeira destas sequências é caracterizada pelos nucleotídeos TATAA/TAA/T e foi denominada *ATA box* ou *Goldeberg Hogness box*. Esta região é rica em adenina e timina, e está localizada a aproximadamente 30 pares de bases (pb) em relação ao sítio correspondente ao *Cap site* ou local onde ocorre uma ligação pirofosfato 5'→ 5' e

que é adicionado a posição 5' da região codificante (Dierks *et al*, 1981; Efstradiadis *et al*, 1980; Grosveld *et al*, 1982; Mathis & Chambon, 1981; Proudfoot, 1979).

A segunda sequência conservada é constituída de nucleotídeos GGC/TCAATCT e é denominada *CAT box*, que está localizada entre 70 a 90 nucleotídeos em relação ao *Cap site*. Essa sequência encontra-se duplicada nos genes γ da Hb F (Benoist *et al*, 1980; Grosveld *et al*, 1982). E finalmente, a sequência CCACCCT situada entre 90 a 105 nucleotídeos da mesma posição e que por sua vez se encontra duplicada no gene β (Charnay *et al*, 1985; Dierkis *et al*, 1983; Everett *et al*, 1983).

Uma sequência de hexanucleotídeos altamente conservada, a AATAAA, foi também identificada na posição 3' da região não codificante dos genes da globina, sendo localizada cerca de 15 19pb 3' a partir do ponto de terminação da transcrição e provavelmente é fundamental para o metabolismo normal do ARNm (Ácido Ribonucléico mensageiro) (Efstradiadis *et al*, 1980; Michelson & Orkin, 1980).

O estudo das regiões promotoras dos genes das globinas permitiu de modo pioneiro o esclarecimento de alguns mecanismos normais do controle da transcrição gênica. Nestes achados tiveram papel preponderante os assim denominados "experimentos da natureza", isto é, mutações que afetam as regiões conservadas anteriormente descritas e que estimulam ou deprimem a síntese das respectivas cadeias protéicas. Assim, foram desenvolvidas diversas estratégias com a finalidade de determinar as sequências de nucleotídeos localizadas na região promotora com importância funcional na transcrição e no controle da expressão dos genes da globina. Variados tipos de mutações foram artificialmente criadas através da remoção de toda uma sequência localizada em determinados pontos dos genes, ou pela substituição de diversos nucleotídeos por segmentos sintéticos e, finalmente, por estudos que

envolviam a substituição simples de um único nucleotídeo por meio de mutagênese química ou bioquímica (Charnay *et al*, 1985; Dierks *et al*, 1981 e 1983; Grosveld *et al*, 1981 e 1982; Mcknight & Kingsbury, 1982; Mellon *et al*, 1981).

O efeito dessas sequências de nucleotídeos sobre a expressão gênica é modulado pela ação de proteínas que interagem com essas regiões do DNA (*trans-acting factors*), estimulando ou inibindo a transcrição. Desse modo, mudanças em um único nucleotídeo dessas regiões promotoras podem interferir com essa interação DNA-proteína e resulta em distúrbios na produção gênica (Mitchell & Tjan, 1989). Essa é a razão subjacente às alterações observadas na expressão gênica secundária às mutações na região promotora de pacientes com talassemia β ou persistência hereditária da hemoglobina fetal (PHHF) (Bunn & Forget, 1986; Stamatoyannopoulos *et al*, 1987).

Além das sequências de nucleotídeos na região promotora, são conhecidos outros locais específicos do DNA nas proximidades dos genes que também podem atuar no controle da expressão gênica. Essas sequências, em geral são conhecidas como *enhancers* e atuam independentemente de sua posição em relação à região promotora. As sequências importantes no controle da expressão gênica, incluindo aquelas da região promotora e os *enhancers*, são genericamente denominadas *cis-acting factors* (Gruss *et al*, 1984; Khoury & Gruss, 1983).

Outra região fundamental para o controle da expressão dos genes do complexo da globina foi descoberta pela investigação de talassemias β secundárias a deleções gênicas distantes do gene β . Essa região foi denominada *Locus Control Region* ou *LCR* (Forrester *et al*, e 1986; Tuan *et al*, 1985). Esta região compreende cerca de seis sítios contendo sequências sensíveis à digestão pela DNase I (*Hypersensitive sites* ou *HS*) e estão localizados entre 6 a 21Kb na posição 5' antes do gene ϵ e cerca de 20Kb

na posição 3' depois do gene β (Figura 2) (Curtin *et al*, 1988; Driscoll *et al*, 1989; Forrester *et al*, 1990; Kioussis *et al*, 1983; Taramelli *et al*, 1986). A análise molecular destes sítios hipersensíveis à DNase I revelou que a *LCR* representa um novo elemento fundamental na regulação dos genes das globinas (Orkin *et al*, 1990). Entre as propriedades já esclarecidas da *LCR* podemos citar: 1) A *LCR* confere alto nível de expressão eritróide específica aos genes das globina ligados *in cis* quando em animais transgênicos. Na realidade, foi a descoberta da *LCR* que possibilitou o aparecimento de modelos animais transgênicos de doenças como a anemia falciforme (Grosveld *et al*, 1987; Ryan *et al*, 1989a e 1989b; Talbot *et al*, 1989); 2) A *LCR* afeta a estrutura cromatínica e o padrão de replicação do ADN em sequências que se estendem por aproximadamente 200 Kb ou mais (Forrester *et al*, 1990); 3) A interação entre cada gene da globina e a *LCR* é exclusiva e regulada de acordo com o estágio do desenvolvimento (Behringer *et al*, 1990; Enver *et al*, 1990; Hanscombe *et al*, 1991; Lindenbaum & Grosveld, 1990; Raich *et al*, e 1992); 4) Sequências de nucleotídeos, provavelmente responsáveis pela função da *LCR* estão localizados no interior dos *HS* que caracterizam a *LCR* nas células eritróides (Forrester *et al*, 1989; Ney *et al*, 1990; Philippsen *et al*, 1990; Talbot *et al*, 1990); 5) A estrutura e função da *LCR* são altamente conservadas durante a evolução (Li *et al*, 1990).

Finalmente, é relevante citar a presença de várias sequências repetidas dentro do grupo de genes β da globina, que apesar de possuírem função ainda desconhecida, representam pontos altamente suscetíveis a evento recombinação dado seu elevado grau de homologia. O primeiro grupo dessas sequências inclui aquele denominado família Alu I, que apresentam aproximadamente 300 nucleotídeos e provavelmente está repetida cerca de 300.000 vezes no genoma humano. A denominação Alu I deriva da presença no interior dessa região de sítios de clivagem da enzima Alu I. Estas sequências são encontradas no grupo de genes da globina β em cópia simples ou dupla,

na posição 5' do gene ϵ , flanqueando os genes γ e ao redor dos genes δ e β (Coggins *et al*, 1980 e 1981; Di Segnie *et al*, 1981; Fritsch *et al*, 1980; Houch *et al*, 1979; Jelinek *et al*, 1982).

Um segundo grupo é representado por sequências de nucleotídeos denominadas família Kpn I ou L1. São maiores e menos frequentes que as Alu I e estão localizadas na posição 3' do gene β e na posição 5' do gene γ^G (Adams *et al*, 1980; Forget, 1981; Jagadeswaran *et al*, 1981; Kaufman *et al*, 1980; Shafit- Zagardo, 1982). O terceiro grupo de sequências repetidas é encontrado entre os genes δ e β (Miesfield *et al*, 1981) e na região IVS2 dos genes γ (Slighton *et al*, 1980; Shen *et al*, 1980), e não possuem denominação específica.

O estudo dos genes da globina, como referido anteriormente revelou-se de fundamental importância no desenvolvimento não só da Genética Médica, como também na compreensão dos mecanismos subjacentes à expressão gênica normal. Nesse contexto, o controle ontogenético normal da expressão dos genes γ representa modelo ideal para a compreensão desses mecanismos. Assim, a investigação de anormalidades que conduzem a distúrbios no controle da expressão normal desses genes, como as PHHF ou as Talassemias delta-beta (Tal- $\delta\beta$) , podem resultar em dados significativos para melhor compreensão do controle gênico durante o desenvolvimento.

***Persistência Hereditária da
Hemoglobina Fetal***

A denominação persistência hereditária da hemoglobina fetal (PHHF) identifica um grupo de condições com ampla heterogeneidade genética, caracterizado pela contínua produção de HbF na vida adulta, sem distúrbio eritropoético e com uma relação equilibrada entre a síntese de cadeias α e não- α (Weatheral & Clegg, 1981; Wood *et al*, 1979). As PHHF são caracterizadas como condições que possuem um fenótipo similar, mas que resultam de defeitos moleculares múltiplos e complexos. As PHHF são comumente classificadas pela análise dos parâmetros hematológicos e da lesão molecular existente. Entre os dados hematológicos, são de importância os níveis relativos das cadeias γ^G , γ^A , β e δ , a percentagem de HbF e seu padrão de distribuição nas hemácias. São denominadas PHHF pancelulares aquelas em que todas as hemácias apresentam HbF detectável, e heterocelulares nos casos em que a HbF é observada em um número restrito de células (Boyer *et al*, 1977; Fessas & Stamatoyannopoulos, 1964; Shepard *et al*, 1962;).

De acordo com a lesão molecular, as PHHF são classificadas em dois grandes grupos: PHHF por deficiências ou deleções gênicas e por mutações de ponto . As deficiências gênicas envolvem grande parte do grupo de genes β e as mutações de ponto são encontradas na região promotora dos genes γ (Stamatoyannopoulos *et al*, 1987).

A frequência da PHHF em populações humanas ainda não está caracterizada, o que talvez se deva, pelo menos em parte, ao fato de seus portadores geralmente serem assintomáticos. Ela é descrita na literatura sob a forma de casos familiares isolados, em várias regiões do globo, principalmente entre negróides, mediterrâneos e asiáticos.

PHHF por deficiências gênicas

Estas formas de PHHF são caracterizadas por grandes deficiências no grupo dos genes β , na presença dos genes codificadores das cadeias γ^G e γ^A da HbF. Os indivíduos heterozigotos possuem níveis de HbF entre 20 à 30% com uma distribuição uniforme nas hemácias e valores de HbA₂ ligeiramente diminuídos ou normais. Em homozigose estão associadas com hemácias ligeiramente microcíticas e hipocrômicas, uma relação de aproximadamente 0,5 na síntese das cadeias α/γ e cerca de 100% de HbF. Uma vez que esta Hb possui uma alta afinidade pelo oxigênio, pode ocorrer uma policitemia moderada (Charache *et al*, 1976; Forget *et al*, 1976).

Até o presente momento, cinco diferentes formas de PHHF foram descritas (Figura 3). A PHHF-1 encontrada em negros dos EEUU e a PHHF-2 em negros de Ghana possuem uma deficiência gênica que envolve quase 105Kb de DNA. A PHHF-1 compreende uma deficiência gênica que começa 3,75Kb antes do gene δ e abrange 95Kb depois do gene β . A PHHF-2 possui os pontos de quebra nas posições 5' e 3' localizados 5 a 6 Kb antes dos descritos para a PHHF-1 (Collins *et al*, 1987; Feingold & Forget, 1989; Fritsch *et al*, 1979; Henthorn *et al*, 1990; Jagadeeswaran *et al*, 1982; Tsai *et al*, 1989; Tuan *et al*, 1979, 1980 e 1983; Van Der Ploeg *et al*, 1980; Vanin *et al*, 1983).

A PHHF-3, descrita em indianos, tem o início da sua deficiência gênica a uma curta distância do descrito para a PHHF-2 e se estende até aproximadamente 30Kb após o gene β (Anagnou *et al*, 1988; Henthorn *et al*, 1986; Kutlar *et al*, 1984; Vanin *et al*, 1983). A PHHF-4, descrita em italianos, tem o início da sua deficiência quase na mesma posição da PHHF-1 e o seu término próximo ao da PHHF-3 (Ottolenghi *et al*, 1982; Saglio *et al*, 1986) . A PHH-5, também descrita em italianos, possui uma deficiência que começa cerca de 3,2Kb antes do gene δ e termina somente 0,75Kb

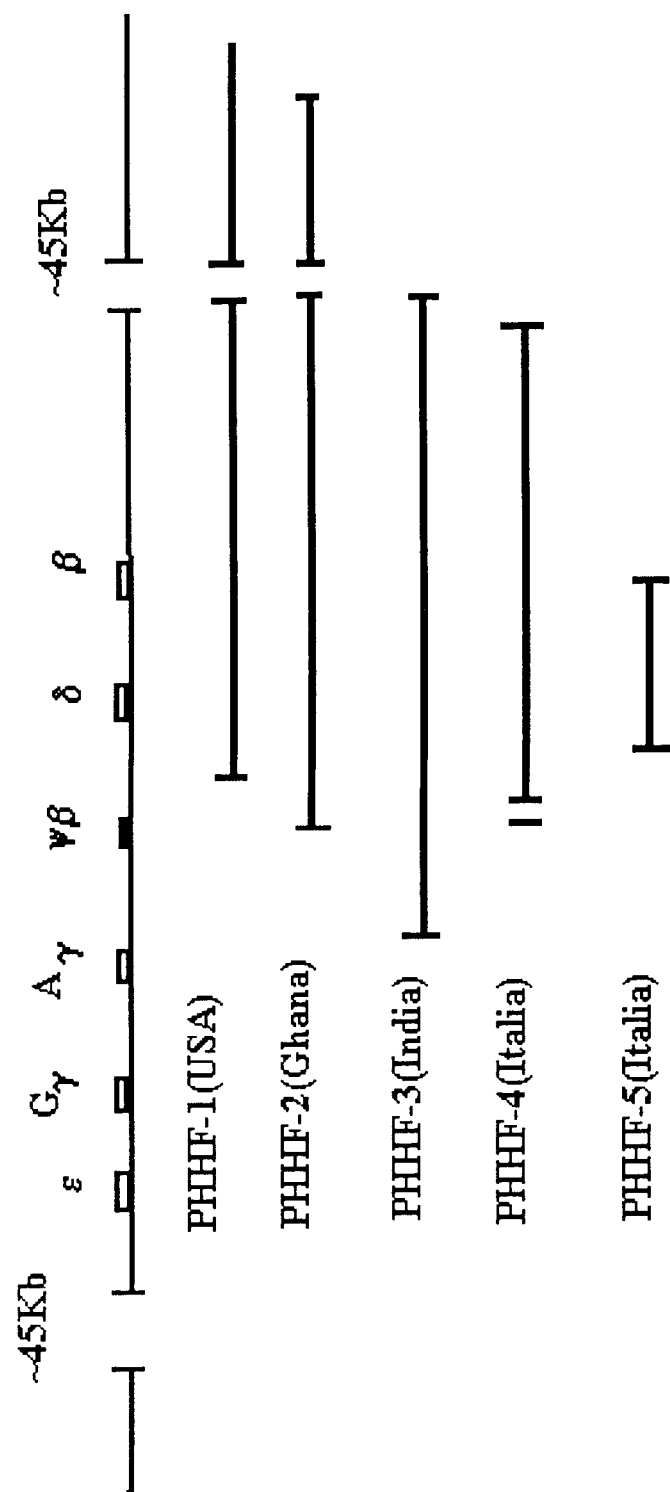


Figura 3. PHF por deficiência gênica.

fora do gene β , dentro de um elemento ativador ou *enhancer* (Camaschella *et al*, 1990).

Algumas hipóteses foram formuladas na tentativa de explicar o fenótipo de PHHF nestas condições. A primeira delas refere-se à presença de um elemento silenciador localizado entre os genes γ^A e δ e que exerceria o controle transcricional dos genes γ . Este elemento seria perdido nas várias deficiências gênicas, desencadeando a síntese aumentada dos genes γ e consequentemente da HbF (Huisman *et al*, 1974). Uma segunda hipótese é a de que elementos regulatórios localizados nas proximidades do ponto de quebra da posição 3' das deleções sejam trazidos para a proximidade dos genes γ em decorrência dos eventos recombinatórios subsequentes à deleção, exercendo desse modo o controle diferencial no mecanismo de expressão destes genes (Feingold & Forget, 1989).

PHHF por mutações de ponto

Algumas formas de PHHF são caracterizadas pela substituição de um único nucleotídeo localizado em locais específicos da região promotora dos genes γ e na ausência de deficiência gênica (Tabela 1). Estas formas de PHHF também são classificadas em pancelulares e heterocelulares de acordo com o padrão de distribuição da HbF nas hemácias (Bollekens & Forget, 1991).

As PHHF pancelulares são sub-divididas segundo o tipo de cadeia γ presente. A PHHF do tipo γ^A foi primeiramente descrita em um paciente proveniente da Grécia (γ^A PHHF-Grega) (Collins *et al*, 1985; Fessas & Stamatoyannopoulos, 1964 ; Sofroniadou *et al*, 1975) e subsequentemente em indivíduos originários da Sardenha (Giglioni *et al*, 1984), China (Farquhar *et al*, 1983) e África (Huang *et al*, 1987). Nos heterozigotos os níveis de HbF variam entre 10 a 20 % com uma relação equilibrada entre as cadeias α / não- α , na presença de índices hematimétricos normais. Em homozigose, os valores de HbF são encontrados ao redor de 24% com cerca de 75% de HbA e HbA₂ ligeiramente diminuída (Camaschella *et al*, 1989). As PHHF pancelulares do tipo γ^G ocorrem predominantemente em negros, com valores de HbF entre 15 a 20% em heterozigotos (Collins *et al*, 1984 a e b; Friedman & Schwartz, 1976; Higgs *et al*, 1979; Huisman *et al*, 1975).

Nas PHHF do tipo heterocelulares são detectados níveis de HbF entre 2 a 10% nos vários tipos descritos (Boyer *et al*, 1975; Wood *et al*, 1975). No tipo suíço, os valores de HbF estão ligeiramente aumentados entre 2 a 3%, na presença de ambas as cadeias γ^G e γ^A (Weatherall & Clegg, 1981). Níveis mais elevados de HbF podem ser observados quando a PHHF está associada a homozigose para talassemia β ou hemoglobina S (Gianni *et al*, 1983; Miyoshi *et al*, 1988; Old *et al*, 1982; Popovich *et*

al, 1986; Wood *et al*, 1976 e 1977;). Este aumento na produção de HbF em geral resulta em evolução clínica menos grave nos pacientes homozigotos para essas hemoglobinopatias e concomitante PHHF (Stamatoyannopoulos *et al*, 1987). O conhecimento dessa particularidade indicou desde a longo tempo que o aumento na síntese de cadeias γ poderia representar terapêutica eficaz nas doenças falciformes e talassemias.

Algumas formas de PHHF heterocelulares contendo níveis de HbF maiores que os encontrados no tipo suíço foram descritas em famílias negras. Assim, em indivíduos portadores do tipo Seattle foram descritas cadeias γ^G e γ^A em proporções normais (Stamatoyannopoulos *et al*, 1987; Stamatoyannopoulos *et al*, 1975) e naqueles do tipo Atlanta e Georgia, onde ocorre o predomínio de cadeias γ^G de 2,4 a 6,0 % (Altay *et al*, 1977; Stoming *et al*, 1989). Em indivíduos com a PHHF do tipo britânico ocorre o predomínio de cadeias γ^A e os níveis de HbF variam entre 5 a 13% nos heterozigotos e entre 19 a 21% nos homozigotos (Tate *et al*, 1986; Weatherall *et al*, 1975), ao passo que em pacientes com PHHF do tipo brasileiro (Costa *et al*, 1990) os níveis de HbF variam de 4,5 a 7% com predomínio de cadeias γ^A . A PHHF do tipo saudita é frequentemente descrito em concomitância com homozigose para HbS ou em portadores da talassemia-S β^0 e está associado a evolução clínica moderada com quantidades elevadas de HbF, geralmente entre 25 a 40% (Pembrey *et al*, 1978; Perine *et al*, 1978).

Estas poucas mutações já identificadas permitiram caracterizar a importância relativa de diferentes locais da região promotora que na interação com os *trans-acting factors* e o grau de ajuste fino existente no controle da transcrição. Assim na γ^A -PHHF grega a mutação é na região -117 com substituição G $\rightarrow$ A e resulta na produção de 15% de HbF, por outro lado na γ^A -PHHF-britânico a mutação está

localizada na posição -198, T→C, e resulta em 3,5 a 10% de HbF. A tabela 1 descreve os dados conhecidos de PHHF-mp.

Até o presente momento vários fatores *Trans* localizados nesta região já foram descritos. Entre eles estão o Sp1, um poderoso ativador transcricional que possui afinidade às regiões -200 (sequência GGGGC), -140 (sequência CACCC) e -50 (sequência GC); o fator CP1 descrito pela sua interação com a região CCAAT-*box*; o CDP, uma proteína de deslocamento da interação com a região CCAAT-*box*; o octâmero-1 (Oct-1) responsável pela interação com a região ATGCAAAT e os fatores para células eritróides, o GATA-1 e o NFE-3 (Fisher & Novock, 1990; Fucharon *et al* , 1990; Gumucio *et al*, 1988; Gumucio *et al*, 1991; Johnson & Mc Knight, 1989; Mantovani *et al*, 1988; Martin *et al*, 1989; Mitchell & Tjian, 1989; Ottolenghi *et al*, 1989; Ponez *et al*, 1989; Ronchi *et al*, 1989; Stoeckert, 1991; Supert-Furga *et al*, 1988) (Figura 4).

Tabela 1. PHHF por mutação de ponto

TIPO	MUTAÇÕES	HbF (%)Heterozigotos
Pancelular γ^G		
Negros	γ^G , -202 C→G	15-25
Negros	γ^G , -175 T→C	20-30
Sardenios	γ^G , -175 T→C	17-21
Japoneses	γ^G , -114 C→T	11-14
Pancelular γ^A		
Sul da Italia	γ^A , -196 C→G	12-16
Chineses	γ^A , -196 C→T	14-21
Negros	γ^A , -175 T→C	36-41
Gregos	γ^A , -117 G→A	10-20
Sardenios	γ^A , -117 G→A	12-16
Negros	γ^A , -117 G→A	11-16
Pancelular $\gamma^G\gamma^A$		
Chineses	Desconhecida	20-25
Heterocelular γ^G		
Negros(Atlanta)	$\gamma^G\gamma^A$, -158 C→T	2,4-3,8
Heterocelular γ^A		
Negros	γ^A , -202 C→T	1,6-3,9
Britanicos	γ^A , -198 T→C	3,5-10
Brasileiros	γ^A , -195 C→G	4,5-7
Hetercelular $\gamma^G\gamma^A$		
Suiça	Desconhecida	1-4
Negros(Seattle)	Região promotora dos genes γ normal	3-8
Negros(Georgia)	Desconhecida	2,6-6

Obs.: Uma deficiência contendo valores de HbF de 30-32% e situada entre as posições -102 a -114 na região promotora do gene γ^A foi descrita em negros.

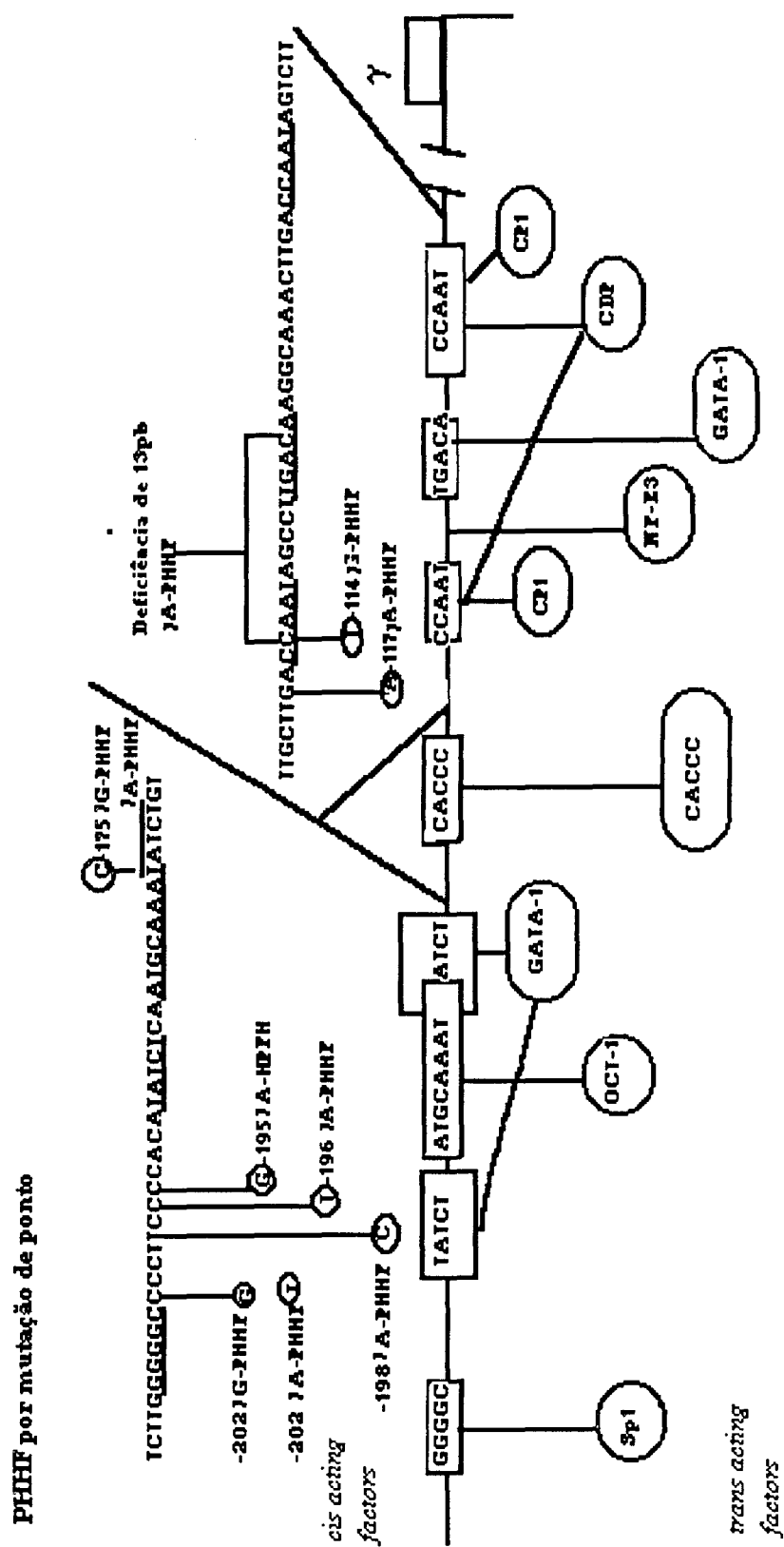


Figura 4. Localização das diversas PHHF por mutações de ponto e dos fatores *Trans*, na região promotora dos genes γ .

Talassemias Delta- beta

As síndromes talassêmicas compreendem um grupo heterogêneo de doenças hereditárias em que existe uma redução no ritmo de síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas da hemoglobina. Esta anormalidade, de natureza complexa, ocasiona, em última análise, a supressão total ou parcial da produção de cadeias α nas α -talassemias e de cadeias β nas talassemias- β . Daí advém hemoglobinizacão deficiente e, conseqüentemente, microcitose e hipocromia características dessas síndromes. Além disso, a síntese de cadeias não afetada permanece inalterada provocando acúmulo e formação de agregados instáveis das cadeias não pareadas. A precipitação desses agregados provoca numerosos efeitos deletérios sobre a hemácia ou seus precursores. São essas lesões as responsáveis pela destruição prematura dos eritroblastos na medula óssea, caracterizando a eritropoese ineficaz comum a essas síndromes, e também pela reduzida sobrevida dos eritrócitos na circulação, determinante do quadro hemolítico (Bank, 1978; Weatherall & Clegg, 1981).

O termo talassemia delta-beta (tal- $\delta\beta$) descreve aqueles casos em que ocorre redução ou ausência de síntese de ambas as cadeias , β e δ , e é caracterizada nos heterozigotos por grande aumento de HbF acompanhado por valores normais ou reduzidos de HbA₂ na presença de hipocromia ou microcitose. Os homozigotos possuem exclusivamente HbF, níveis moderados de anemia e evolução clínica em geral benigna. Devido ao aumento de HbF, a relação entre cadeias α /não- α apresenta desequilíbrio menor que aquele encontrado em outras formas de talassemias- β . Os portadores da associação tal- $\delta\beta$ e talassemias- β *in trans* apresentam um quadro clínico de talassemia intermediária com níveis elevados de HbF (Bunn & Forget, 1986; Stamatoyannopoulos *et al*, 1987; Bollenkens & Forget, 1991).

Naqueles casos em que a caracterização molecular destas síndromes foi levada a efeito, foram detectadas deficiências gênicas no grupo dos genes β , que em geral incluem os genes β e δ ou parte do gene δ . A classificação das talassemias- $\delta\beta$ é feita de

acordo com as cadeias γ encontradas. Assim, a talassemia- $\delta\beta$ observada em sicilianos é denominada $\text{tal-}\gamma^G\gamma^A(\delta\beta)^\circ$ e aquela descrita em indianos e chineses é denominada $\text{tal-}\gamma^A(\gamma^G\delta\beta)^\circ$.

As $\text{tal-}\gamma^G\gamma^A(\delta\beta)^\circ$ são encontradas principalmente nas populações do Mediterrâneo. Os níveis de HbF variam de 5 a 15% nos heterozigotos e os homozigotos para este tipo de alteração apresentam um quadro clínico de talassemia intermediária com níveis de Hb próximos de 10g/l e relação entre as sínteses de cadeias α/γ aproximadamente de 2,4 (Anagou *et al*, 1985; Bernards *et al*, 1979; Camaschella *et al*, 1986 e 1987; Feingold & Forget, 1989; Fritsch *et al*, 1979; Henthorn *et al*, 1990; Kuloziz *et al*, 1988; Matsunaga *et al*, 1985; Mishima *et al*, 1989 e 1990; Ottolenghi *et al*, 1979 e 1988a; Shiokowa *et al*, 1988; Trent *et al*, 1988; Tuan *et al*, 1979 e 1983; Zeng *et al*, 1985; Zhang *et al*, 1988). Nesses casos a deleção gênica é heterogênea incluindo desde pequenas deficiências como a Tal- $\delta\beta^\circ$ Corfu de 7,2Kb às enormes deficiências como o tipo espanhola em que compreende a perda de quase 100Kb.

Vários casos de $\text{tal-}\gamma^G(\gamma^A\delta\beta)^\circ$ foram descritos em diferentes populações, afetando principalmente indianos e chineses. Os heterozigotos possuem cerca de 5 a 15% de HbF com predominância das cadeias do tipo γ^G . Os homozigotos produzem exclusivamente HbF e apresentam um quadro clínico de talassemia intermediária. Nestes casos a deficiência gênica sempre inclui parte ou todo o gene γ^A , preservando o gene γ^G . Dentre as $\text{tal-}\gamma^G(\gamma^A\delta\beta)^\circ$ tem particular interesse a $\text{tal-}\gamma^G(\gamma^A\delta\beta)^\circ$ descrita em chineses que possui o seu ponto de quebra na posição 5' 10 Kb antes do PHHF-dg do tipo 2, e possui ponto de quebra na posição 3', semelhante ao que ocorre na PHHF-dg do tipo 1 e 2, sem no entanto gerar o fenótipo de PHHF. (Anagnou *et al*, 1984 e 1988; Fodde *et al*, 1990; Fritsch *et al*, 1979; George *et al*, 1986; Henthorn *et al*, 1985 e 1990; Jennings *et al*, 1985; Jones *et al*, 1981a e b; Losekoot *et al*, 1990; Mager *et al*, 1985; Nakatsuji *et al*, 1984; Orkin *et al*, 1979; Trent *et al*, 1984; Tuan *et al*, 1979).

Existem alguns casos de talassemia, diferentes das descritas anteriormente, as tal-($\gamma\delta\beta$)^o que são caracterizadas pela ausência total na produção das cadeias γ , δ e β . Indivíduos heterozigotos apresentam uma anemia hemolítica transitória no período perinatal, e na vida adulta apresentam características similares às encontradas nos traços talassêmicos. Indivíduos homozigotos não foram descritos até o presente momento. Nesses casos a deleção inclui os dois genes γ (Curtin *et al*, 1985; Driscoll *et al*, 1989; Diaz-Chico *et al*, 1988; Fearon *et al*, 1983; Orkin *et al*, 1981; Piratsu *et al*, 1983; Talbot *et al*, 1989; Trent *et al*, 1990; Tuan *et al*, 1985; Van Der Ploeg *et al*, 1980).

Foram descritas duas formas de tal- $\delta\beta$ na ausência de deficiência gênica. A primeira delas, descrita em pacientes originários da Sardenha, do tipo tal- $\gamma^A\delta\beta$ possui substituição de bases C→G na posição -196 da região promotora do gene γ^A e CAG →TAG no codon 39 de gene β . Os níveis de HbF situam-se entre 10 a 20 % (CAO *et al*, 1982; Guida *et al*, 1984; Ottolenghi *et al*, 1987; Piratsu *et al*, 1984). A segunda, do tipo $\gamma^G\gamma^A\delta\beta$ -tal foi encontrada em indivíduos chineses. Esta forma de tal $\delta\beta$ apresenta as regiões promotoras dos genes γ normais e uma substituição A→G na posição -29 do gene β com valores de HbF em torno de 22,3% (Atweh *et al*, 1986 e 1988).

A tabela 2 descreve os tipos de tal- $\delta\beta$ por mutações de ponto e as figuras 5 e 6 as deficiências gênicas conhecidas.

Um aspecto interessante e que transcende o interesse acadêmico é que alterações gênicas distintas podem resultar em PHHF, sem maiores repercursões clínicas, ou tal- $\delta\beta$ com nítida redução na produção das cadeias não- α . Assim, indivíduos portadores de PHHF possuem níveis elevados de HbF, acompanhados por hemácias de tamanho e conteúdo hemoglobínico normais. Já nos indivíduos portadores da talassemia- $\delta\beta$, o

aumento da HbF é acompanhado por hemácias microcíticas e hipocromicas e valores normais ou ligeiramente diminuídos da HbA₂. O estudo molecular nestas condições tem sido de grande importância, principalmente por contribuir para a elucidação do mecanismo de expressão destes genes.

A caracterização molecular dos diversos casos de PHHF e tal- $\delta\beta$ conduzem à formulação de algumas hipóteses para esse fato. Assim podemos citar a hipótese formulada por Feingold e Forget (1989), que tenta explicar a diferenciação entre os fenótipos de PHHF e tal- $\delta\beta$. Nesta hipótese a presença de uma região 3D intacta e trazida para a proximidade dos genes γ em decorrência da deficiência gênica levaria ao desenvolvimento do fenótipo de PHHF e que alterações nesta mesma região desencadeariam o fenótipo de tal- $\delta\beta$. No entanto deve ser enfatizado que esta questão permanece por ser esclarecida.

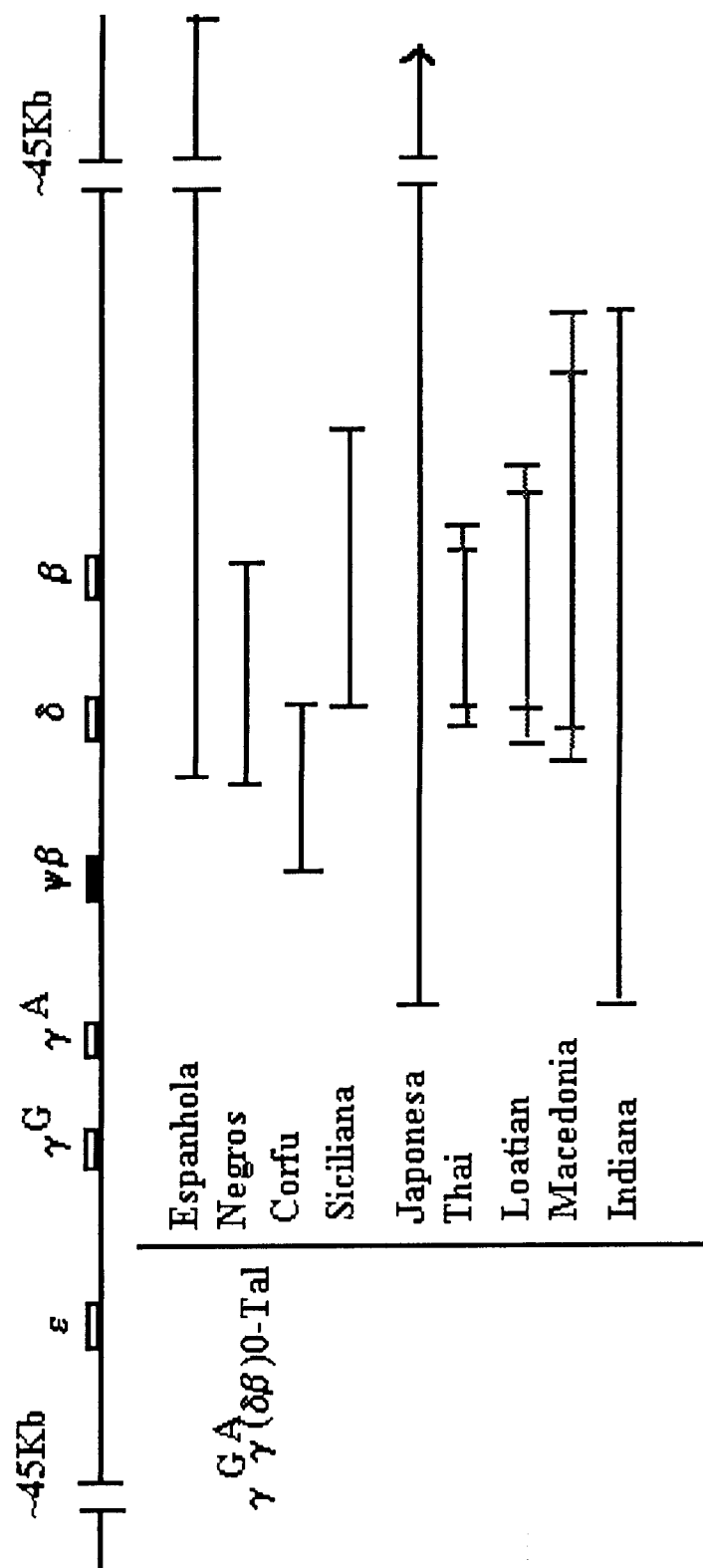


Figura 5. Talassemias $\delta\beta$ associadas a deficiências gênicas no grupo de genes β .

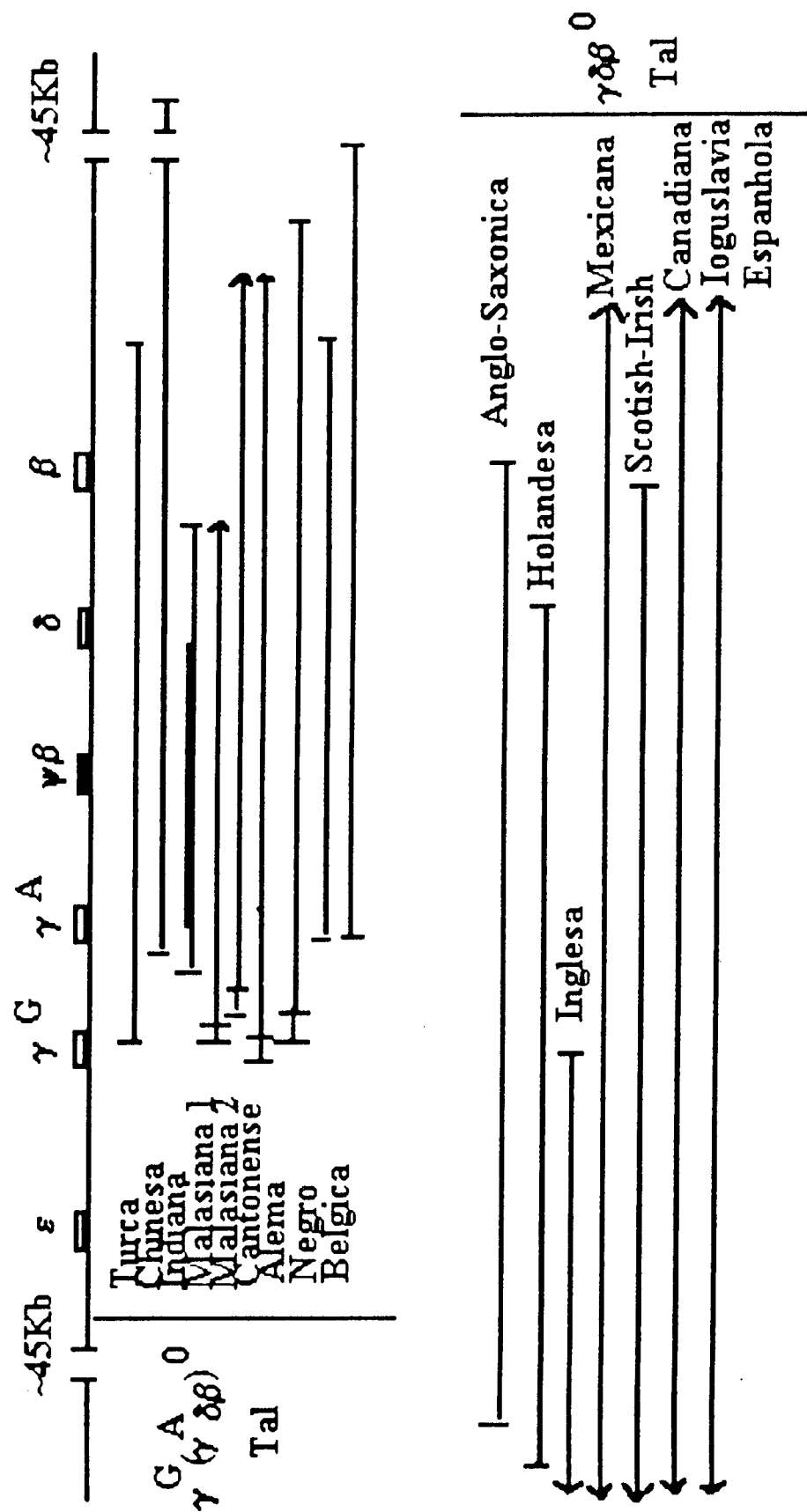


Figura 6. Talassemias $\delta\beta$ associadas a deficiências gênicas no grupo de genes β .

Tabela 2. Talassemias- $\delta\beta$ por mutações de ponto

TIPO	MUTAÇÕES	HbF (%)Heterozigotos
Talassemia-$\gamma^A\delta\beta$		
Sardenios	γ^A , -196 C→T β , codon 39 CAG→TAG	10-20
Talassemia-$\gamma^G\delta\beta$		
Chineses	Região promotora dos genes γ normal β , -29 A→G	22,3

OBJETIVOS

Como consequência da identificação prévia de um tipo inédito de PHHF na população brasileira (Costa *et al*, 1990), foi levado a efeito um rastreamento sistemático para identificação de PHHF e Tal- $\delta\beta$ em doadores de sangue do Hemocentro-UNICAMP e em pacientes do ambulatório de hemoglobinopatias da UNICAMP e Escola Paulista de Medicina.

Foram identificados quatro indivíduos portadores de PHHF e um de tal- $\delta\beta$. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi levar a efeito a caracterização das bases moleculares das PHHF e tal- $\delta\beta$ desses indivíduos e contribuir para um melhor conhecimento das alterações moleculares das hemoglobinopatias no Brasil e adicionalmente fornecer subsídios para o esclarecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na gênese dessas condições.

CASUÍSTICA
E
MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

Foram estudados quatro portadores de PHHF e um de $\delta\beta$ -talassemia. Os pacientes estão em atendimento regular nos ambulatórios de Hematologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP ou da Escola Paulista de Medicina.

CASO 1

Sexo masculino, 36 anos de idade, branco, com descendência africana, doador de sangue, sem alterações clínicas significativas. A anormalidade da hemoglobina foi detectada no rastreamento padrão após doação de sangue.

CASO 2

Sexo feminino, 34 anos de idade, negróide, doador de sangue, sem alterações clínicas significativas. A anormalidade da hemoglobina foi detectada no rastreamento padrão após doação de sangue.

CASO 3

Sexo masculino, 50 anos de idade, negróide, doador de sangue, sem alterações clínicas significativas. A anormalidade da hemoglobina foi detectada no rastreamento padrão após doação de sangue.

CASO 4

Sexo masculino, 9 anos de idade, negróide, com história de palidez cutâneo-mucosa acompanhada de esplenomegalia desde os 18 meses de idade. No exame físico apresentava fígado palpável a 3cm do rebordo costal direito, baço palpável a 7 cm do rebordo costal esquerdo, e o raio X do crânio revelou aumento da diploe óssea. Em razão das acentuadas alterações ósseas encontra-se em regime terapêutico, com transfusões sanguíneas e quelante de ferro.

CASO 5

Sexo masculino, 32 anos de idade, branco, com descendência italiana, com história de anemia desde o primeiro ano de idade. No exame físico apresentava palidez, icterícia e hepato-esplenomegalia. Aos seis anos de idade foi esplenectomizado. Refere ter recebido ocasionais transfusões sanguíneas após esplenectomia.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue venoso (5-20ml) foram coletadas em EDTA (Sal di-sódico do ácido etilenodinitrotetracético) como anticoagulante, na concentração de 1,5mg/ml (Dacie & Lewis, 1984).

3.2.2. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Os valores hematológicos e índices hematimétricos foram determinados com a utilização de contador eletrônico Coulter Counter modelo T8-90, no Laboratório de Hematologia do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas e Hospital de Clínicas da UNICAMP.

A análise morfológica das hemácias foi realizada pela observação microscópica dos esfregaços sanguíneos corados pela técnica de Wright-Giemsa (Dacie & Lewis, 1984).

3.2.3. ANÁLISE DAS HEMOGLOBINAS

3.2.3.1. PREPARO DO HEMOLISADO

As hemácias foram lavadas três vezes em solução salina isotônica e lisadas em 1,5 vol de água e 0,4 vol de tetracloreto de carbono (CCl₄) à temperatura ambiente por 15 minutos, após agitação vigorosa. O estroma foi removido por centrifugação a 2.5000 rpm por 30 minutos e o hemolisado obtido foi utilizado para as análises eletroforéticas e cromatográficas.

3.2.3.2. DETERMINAÇÃO DO PADRÃO ELETROFORÉTICO

A análise qualitativa das hemoglobinas foi realizada pela corrida eletroforética do hemolisado, em fitas de acetato de celulose e tampão Tris-EDTA-Borato pH 8,9 (Tris (Hidroximetil) amino metano-10,2g; EDTA -0,6g; ácido bórico-3,2g; água deionizada para 1l), por 50 minutos a 220 Volts (Dacie & Lewis, 1984).

3.2.3.3. DOSAGEM DA Hb A₂

A HbA₂ foi quantificada pela eluição das fitas de acetato de celulose, após corrida eletroforética de 10µl do hemolisado, por 50 minutos a 220 Volts, em tampão Tris-EDTA-Borato pH 8,9 (Dacie & Lewis, 1984).

3.2.3.4. ANÁLISE DA HbF

A) QUANTIFICAÇÃO

A HbF foi quantificada pelo método de desnaturação alcalina. A técnica consiste na adição de 0,2ml do hemolisado a 3,2ml de solução de NaOH 0,083N e 6,8ml de solução de Sulfato de amônio saturada a 50%. Após filtração foi realizada a leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 415nm (Betke *et al*, 1959).

B) DISTRIBUIÇÃO INTRACELULAR DA HbF

O padrão de distribuição da HbF nas hemácias foi analisado pela técnica citoquímica de eluição ácida descrita por Kleihauer (Dacie & Lewis, 1984).

A técnica foi realizada em esfregaços sanguíneos recém preparados, fixados em etanol a 80% e tratados com mistura das soluções A e B na proporção de 5:1 (Solução A: Hematoxilina-7,5g/l em etanol a 90%; Solução B: FeCl₃ (Cloreto férrico)- 24g; HCl 2,5 mol/l-20ml; água destilada para 1l). Os esfregaços foram contra-corados em Eosina (2,5 g/l) (Dacie & Lewis, 1984).

C) ANÁLISE DAS CADEIAS γ DA HbF

A análise qualitativa cadeias γ^G e γ^A foi realizada pela eletroforese em gel de poliacrilamida-Triton-Uréia• com corrente constante de 6mA durante 12 horas, após concentração das cadeias γ por diálise em água destilada.

Na corrida eletroforética foram utilizados 20 μ l do hemolisado previamente diluído em tampão contendo uréia 8M-5ml; ácido acético glacial-0,5ml; 2-mercaptoetanol-0,5ml e pironina Y- (2mg). Após todo o procedimento, o gel foi corado em *Coomassie brilliant blue* (Alter *et al*, 1980).

A quantificação das cadeias γ foi também realizada em alguns casos pela técnica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em fase reversa (Huisman 1980, 1981a e b), no Laboratório de Química de Proteínas. do *Medical College of Georgia-USA* e a síntese de cadeias na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo Prof. Dr. Fernando F. Costa.

- Acrilamida-3g; bis-acrilamida- 20mg; Uréia 8M-18,75ml; Triton X-100-0,5ml; Ácido acético glacial-1,25ml; TEMED (Tetra metileno diamina)-0,125ml; Persulfato de amonio-15mg; água destilada-5ml

3.3. ANÁLISE MOLECULAR

As deficiências gênicas foram caracterizadas com o emprego da técnica de *Southern Blot* e as mutações de ponto pelas técnicas de sequenciamento direto após amplificação dos fragmentos gênicos pela Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR*). A confirmação de alguns casos foi levada a efeito pela hibridização alelo específica (ASO) de fragmentos gênicos imobilizados em filtros de nylon pelo método de *dot-blot*, ou por digestão com enzimas cujos sítios eram abolidos pela mutação.

3.3.1. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA foi isolado dos leucócitos a partir de 10-20ml de sangue venoso (Ponez *et al*, 1982; Sonati, 1990). O sangue foi inicialmente centrifugado a 2.500 rpm por 15 minutos. Ao conglomerado de hemácias foi adicionado solução de NH_4Cl 0,144M (Cloreto de amonio) na proporção de 5 vezes o volume de células e solução de NH_4HCO_3 0,01M (Bicarbonato de amonio) na proporção de 0,5 vezes o volume de células. A solução foi incubada à temperatura ambiente por 20 minutos e seguida de centrifugação por 15 minutos a 2.500 rpm a 4°C. As soluções de cloreto e bicarbonato de amônio proporcionam a lise das hemácias. Esta etapa foi repetida até a obtenção de um precipitado nuclear de leucócitos livre de hemácias.

Os leucócitos foram dissolvidos em 10ml de tampão contendo NaCl 0,3M, EDTA 10mM, Tris/HCl pH 7,5 10mM, Uréia 7M, SDS (duodecil sulfato de sódio 0,5%) e incubados a 37°C por aproximadamente 12hs ou até completa lise dos leucócitos.

Após incubação foram realizadas três extrações com igual volume de mistura contendo fenol (redistilado e saturado em Tris/HCl pH8,0 200Mm contendo 0,1% de hidroxiquinolina), clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1. Cada extração foi seguida por centrifugação a 5.000rpm durante 15 minutos. A camada superior contendo o DNA foi cuidadosamente transferida para um novo tubo sem remover a camada de proteínas formada entre o DNA e o fenol. Uma última extração foi realizada utilizando-se igual volume de mistura clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 24:1. A solução obtida foi então precipitada pela adição de etanol absoluto gelado (2,5 vezes o volume) e de acetato de sódio 3M (10% do volume).

O DNA precipitado foi lavado em etanol a 70%, para eliminar resíduos de fenol e sal. Após descarte do álcool, o DNA foi diluído em água deionizada estéril em volume proporcional ao tamanho do precipitado obtido.

A concentração do DNA foi determinada em espectrofotometro pela leitura das densidades óticas nos comprimentos de onda 260 e 280nm em luz ultravioleta. O DNA foi considerado ótimo para análise quando a relação entre as densidades óticas obtidas nos comprimentos de onda utilizados situava-se entre 1,8 e 2,0. O encontro de uma relação inferior a 1,8 indica a presença de proteínas e acima de 2,0, alto conteúdo de RNA (Maniatis *et al*, 1989).

3.3.2. METODOLOGIA UTILIZADA PARA A IDENTIFICAÇÃO DAS DEFICIÊNCIAS GÊNICAS

A. DIGESTÃO DO DNA GENÔMICO, ELETROFORESE E *SOUTHERN* BLOT

Cerca de 7 a 10µg do DNA genômico obtido no item 3.3.1 foi digerido com as endonucleases de restrição Apa I, Bam HI, Bgl II, Eco RI, Hind III, Hpa I, Pst I, Pvu II,

Taq I e Xba I, de acordo com as condições recomendadas pelo fabricante (*New England Biolab*). Os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% usando o DNA λ digerido com a enzima Hind III como marcador de peso molecular. O tampão TEA (Tris- Acetato 0,04M; EDTA 0,01M pH 8,3) foi utilizado na preparação da agarose e na eletroforese realizada em cuba horizontal (*Bio Rad DNA sub cell*) por 18hs a temperatura ambiente.

Após a corrida eletroforética o DNA contido no gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5mg/ml) e visualizado em luz ultravioleta. O DNA foi então tratado em solução de HCl 0,1M (ácido clorídrico) por 10 minutos para a purificação dos fragmentos grandes; lavado duas vezes por 30 minutos em solução de NaOH 0,5M e NaCl 1,5M para desnaturação da hélice dupla de DNA e duas vezes de 45 minutos em solução de NaCl 3M e Tris/HCl 0,5M pH7,5 para a neutralização. As lavagens foram realizadas à temperatura ambiente sob agitação constante.

Após a neutralização, o DNA contido no gel foi transferido para membrana de nylon (*Hybond N+- Amersham*) usando solução de SSC 20X (NaCl 3M; Citrato de sódio ($C_6H_5Na_3O_7$) 0,3M) como líquido de transferência (*Southern et al*, 1975; *Maniattis*, 1989). O aparato de transferência foi mantido à temperatura ambiente por aproximadamente 24hs. A membrana foi então cuidadosamente identificada e lavada por 2 minutos em solução de SSC 2X, com a finalidade de retirar o excesso de sal. O DNA foi fixado à membrana por 2hs a 81°C.

B. PRÉ-HIBRIDIZAÇÃO E HIBRIDIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

A membrana obtida no item A foi colocada em recipiente plástico contendo 10ml de solução de pré-hibridização (Quadro 1) e incubada a 42°C por 2hs sob

agitação constante. Esta solução foi substituída por 10ml de solução de hibridização (Quadro 1) contendo sonda específica para o gene em estudo. A hibridização foi realizada por período mínimo de 12hs na mesma temperatura da pré-hibridização.

Após a hibridização, as membranas foram lavadas à temperatura ambiente por duas vezes em solução SSC 2X, SDS 0,1% e uma vez em solução SSC 1X, SDS 0,1% por 30 minutos. Foram realizadas lavagens opcionais a 55°C em soluções SSC 0,5%, SDS 0,1% e SSC 0,1% , SDS 0,1% observando-se a presença de radioatividade inespecífica, pelo monitoramento com contador Geiger (*Ludlum Measurements Inc. Model 3, Survey Meter*).

As membranas foram secas , envoltas em filme de PVC e colocadas em cassetes contendo filme *KODAK X-OMAT*, com intensificador. O filme foi revelado após exposição de 12hs a -70°C utilizando-se processador *KODAK X-OMAT M20*.

A posição das bandas obtidas nas auto-radiografias foi determinada levando-se em conta que a mobilidade do DNA é proporcional ao logarítmo do seu peso molecular expresso em Kb. O tamanho dos fragmentos foi determinado por gráfico contendo a distância das bandas a partir do ponto de aplicação *versus* a curva padrão do marcador de peso molecular, medidas em centímetros.

Quadro 1. Solução de pré-hibridização e hibridização

Reagentes	Pré-hibridização		Hibridização	
	Quantidade Utilizada	Concentração Final	Quantidade Utilizada	Concentração Final
Formamida (CH₃NO)	50 ml	50%	50 ml	50%
SSC 20x (NaCl 3M ; C₆H₅M₃O₇ 0,3M)	25 ml	5 x	25 ml	5 x
Tris/HCl 2M pH 7,5	1 ml	0,02 M	1 ml	0,02 M
Denhardt's 100x (Ficoll 400 2,0% ; Polivinil pirrolidone 2,0% ; Soro albumina bovina 2,0% (Fração V))	10 ml	10 x	2 ml	2 x
SDS (dodecil sulfato de sódio)	10 ml	1%	10 ml	1%
Dextran-Sulfato 50% *1	-	-	10 ml	5%
H₂O	4 ml	4%	20 ml	2%
Volume Total	100 ml	-	100 ml	-
SS DNA (10mg/ml) *2 (DNA de Esperma de Salmão)	100 µl	100 µg/ml	100 µl	100 µg/ml

Nota:

*1 - Aquecer a solução de Dextran Sulfato a 42°C antes de adicionar a solução de hibridização.

*2 - Adicionar o SS DNA à solução de pré e hibridização após desnaturação durante 5' em banho-maria fervente.

C. OBTENÇÃO DAS SONDAS

A tabela 3 descreve as sondas utilizadas no mapeamento dos genes do grupo β da globina, para a detecção das deficiências gênicas.

As sondas foram obtidas em experimentos de transformação bacteriana (Maniatis *et al*,1989) utilizando-se células competentes *Escherichia coli DH5 α* (GIBCO BRL life technologies INC). Após cada transformação foram realizadas preparações de DNA plasmidial em pequena (*Magic minipreps DNA purification system PROMEGA Kit*) e grande escala (*plasmid maxi preparations- QIAGEN Kit*) seguidas de digestão com enzimas de restrição específicas para cada sonda, com a finalidade de comprovar efetividade da transformação e obtenção das sondas. Os fragmentos de DNA foram purificados por *gene clean purification Kit* (BIO 101) após corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% em tampão TAE.

D. MARCAÇÃO DAS SONDAS

As sondas foram marcadas com α fosforo 32 por *Nick translation* (GIBCO-BRL) ou *Random primed* (USB).

A técnica de *Nick translation* utiliza a enzima DNA Polimerase I , que tem a capacidade de adicionar resíduos de nucleotídeos à hidroxila terminal situada na posição 3' criada a partir da fragmentação da hélice dupla de DNA. Além disso, a enzima possui a atividade exonucleásica 5'→3' podendo remover nucleotídeos do lado 5' do DNA fragmentado. Desta forma, a enzima possui a capacidade de eliminar nucleotídeos provenientes da posição 5' e adicionar nucleotídeos a posição 3', o que resulta em um movimento contínuo de síntese do DNA. Com a substituição dos

Tabela 3. Sondas utilizados no mapeamento gênico do grupo de genes β

SONDAS	LOCALIZAÇÃO	TAMANHO DO FRAGMENTO (Kb)	REFERÊNCIAS
P1.45'c	5'c	1,4	Zeng <i>et al</i> ,1985
p46 γ^G pm	γ (IVSII)	0,457	Kutlar <i>et al</i> , 1983
p $\gamma\delta$ 1.6 β x	$\psi\beta$	1,6	Kutlar <i>et al</i> ,1983
RIII	4Kb 5' δ	0,45	Saglio <i>et al</i> , 1986
p α 31.8	5' δ	0,5	Camaschella <i>et al</i> ,1990
PstII-2.3Kb δ	δ IVSII	1,0	Zeng <i>et al</i> , 1985
pBam-1,8Kb β	5' β	1,8	Zeng <i>et al</i> ,1985
p β IVSII	β IVSII	0,950	Zenh <i>et al</i> , 1985
3'III	~30Kb3' β	0,680	Hentorn <i>et al</i> ,1986
PRK29	~18Kb3' β	1,2	Camaschella <i>et al</i> ,1990
pHPFH1-3D	~95Kb3' β	0,8	Tuan <i>et al</i> , 1983
pHPFH1 7.6	~4,2Kb após o probe 3D	0,8	Feingold & Forget, 1989
p21.3	3' FHIF-1	1,0	Feingold & Forget,1989

Obs: As sondas utilizadas no presente trabalho foram gentilmente cedidas pelos Dr. O. Smith (*Wiscosin University*), T. A. Stoming e T.H.J. Huisman (*The Medical College of Georgia*) e B. Forget (*Yale University*).

resíduos já existentes por nucleotídeos radioativos é possível preparar DNA altamente marcado com o α fosforo 32 dCTP (50 μ Ci, 3.000 Ci/mMol) (Maniatis *et al*, 1989). A reação foi executada utilizando-se cerca de 500ng de DNA plasmidial, 10 μ l da solução A2 (mistura de desoxinucleotídeos trifosfato dATP, dGTP, e dTTP), 10 μ l de α fosforo 32, 69 μ l de água destilada e 10 μ l da solução C (DNA polimerase I), formando um total de 100 μ l. A reação foi incubada por 1,5hs à temperatura de 15°C. Após esse período a reação foi interrompida pela adição de 100 μ l de tampão STE (Tris/HCl 10mM, EDTA 1mM pH 8,0 e NaCl 0,1M).

A técnica de *Random primed* foi utilizada para a marcação dos fragmentos obtidos a partir do DNA plasmidial. Nesta técnica o DNA é desnaturado e misturado a *primers* (iniciadores) ao acaso (*Random*) com molaridade alta. A reação utiliza a enzima *Klenow*, um fragmento da DNA polimerase I, que perde a atividade exonucleásica 5'→3'. Devido a ausência desta atividade, os nucleotídeos radioativos incorporados durante a marcação não são liberados como monofosfatos (Maniatis *et al*, 1989). A reação foi realizada utilizando-se 100ng da sonda em quantidade de água destilada suficiente para formar um volume de 9 μ l. O DNA foi então desnaturado a 100°C por 10 minutos e imediatamente colocado no gelo. Após esse período, foi adicionado ao DNA, 3 μ l da mistura de nucleotídeos (dATP, dGTP, dTTP), 2 μ l da mistura contendo os *primers*, 5 μ l de α fosforo 32 dCTP, 1 μ l da enzima *Klenow* (5U/ μ l) e água destilada para um volume total de 20 μ l. A reação foi incubada durante 1,5hs a 37° e interrompida pela adição de 130 μ l do tampão STE.

Após a marcação, as sondas obtidas nas duas reações foram purificadas em coluna de Sephadex G-50, equilibradas com tampão STE. A incorporação dos nucleotídeos marcados foi estimada por leitura da radioatividade em detector de emissão beta (Beckman modelo LS5801 and LS5000 TD/TA). As marcações adequadas para hibridização situavam-se entre 1×10^7 a 1×10^8 cpm/ μ g de DNA.

3.3.3. METODOLOGIA UTILIZADA PARA A IDENTIFICAÇÃO DAS MUTAÇÕES DE PONTO

A) AMPLIFICAÇÃO GÊNICA

As amostras de DNA estudadas foram amplificadas pela Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR*) (Erlich, 1989; Mullis e Falona, 1987; Saki *et al*, 1985 e 1988).

Foram utilizadas amplificações simétrica e assimétrica do DNA (Figura 7). A amplificação simétrica foi realizada com concentrações iguais dos *primers* (100pmol de cada), com obtenção do DNA em hélice dupla. Na amplificação assimétrica foram utilizadas concentrações desiguais dos *primers* (1pmol e 100pmols) o que dá origem a amplificação de fragmentos predominantemente de hélice simples que são utilizados para o sequenciamento (Tabela 4) (Figura 8) (Stoming *et al*, 1989).

Cerca de 1µg de DNA genômico foi amplificado em 100µl de tampão contendo 200mM de MOPS (3-[*N-Morpholino*] *propanesulfonic acid*), 50 mM de cloreto de potássio (KCl), 3mM de cloreto de magnésio (MgCL₂), 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP- *Pharmacia*), *primers* em concentrações que variavam de acordo com o tipo de amplificação a ser realizada (simétrica ou assimétrica) e 2,5 unidades (0,5µl) de Taq DNA polimerase (*PROMEGA*). Ao volume final foram adicionados 50µl de óleo mineral. As condições da reação consistiram de desnaturação inicial a 99°C por 2 minutos e a 95°C por 10 minutos, seguido de 38 ciclos que compreendiam desnaturação a 95°C, por 60 segundos, pareamento a 58°C, por 60 segundos, e extensão a 72°C, por 60 segundos. Os dois últimos ciclos tiveram o período de extensão prolongado por 7 minutos. Os

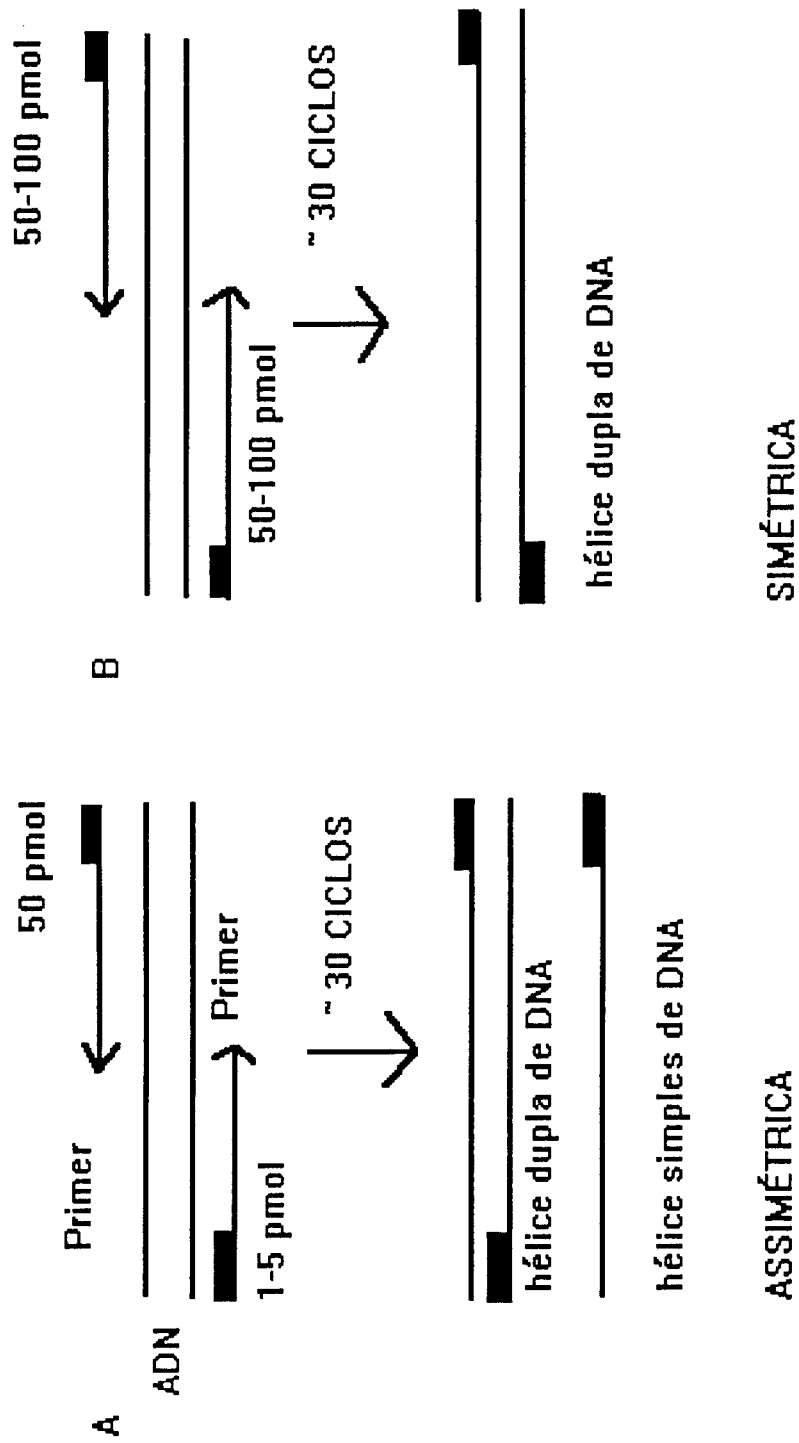


Figura 7. Amplificação simétrica e assimétrica.

Tabela 4. *Primers* utilizados na amplificação e sequenciamento dos genes γ e β

Amplificação	
GCCAAGGAGAGGTACGGCTGTCAT (1)	-139 à -116, β -direto
ATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGG (2)	IVS2 45 à 75, β -reverso
TGAAACTGTGGTCTTTATGAAAATTG (3)	-622 à -596, γ^A -direto
GCACTGAAACTGTTGCTTTATAGGAT (4)	-621 à -590, γ^G -direto
GGCGTCTGGACTAGGAGCTTATTG (5)	+32 à +55, γ^A e γ^G - reverso
Sequenciamento	
Gene β	
GGAGCCACACCCTAGGGTTGG (6)	-97 a -77
GCAGGTTGGTATCAAGGT (7)	Exon 1, Codon 29 a IVS1-14
GTGGTCTACCCTTGGACCC (8)	Exon 1, Codon 34 a Codon 39
Gene γ	
AGAAATTAAGAGATAATGG (9)	-579 a -561
GAAGTTCCTGGTATCCTC (10)	-338 a - 320
TGAAAACGGTCCCTGGCTAA (11)	-166 a -148

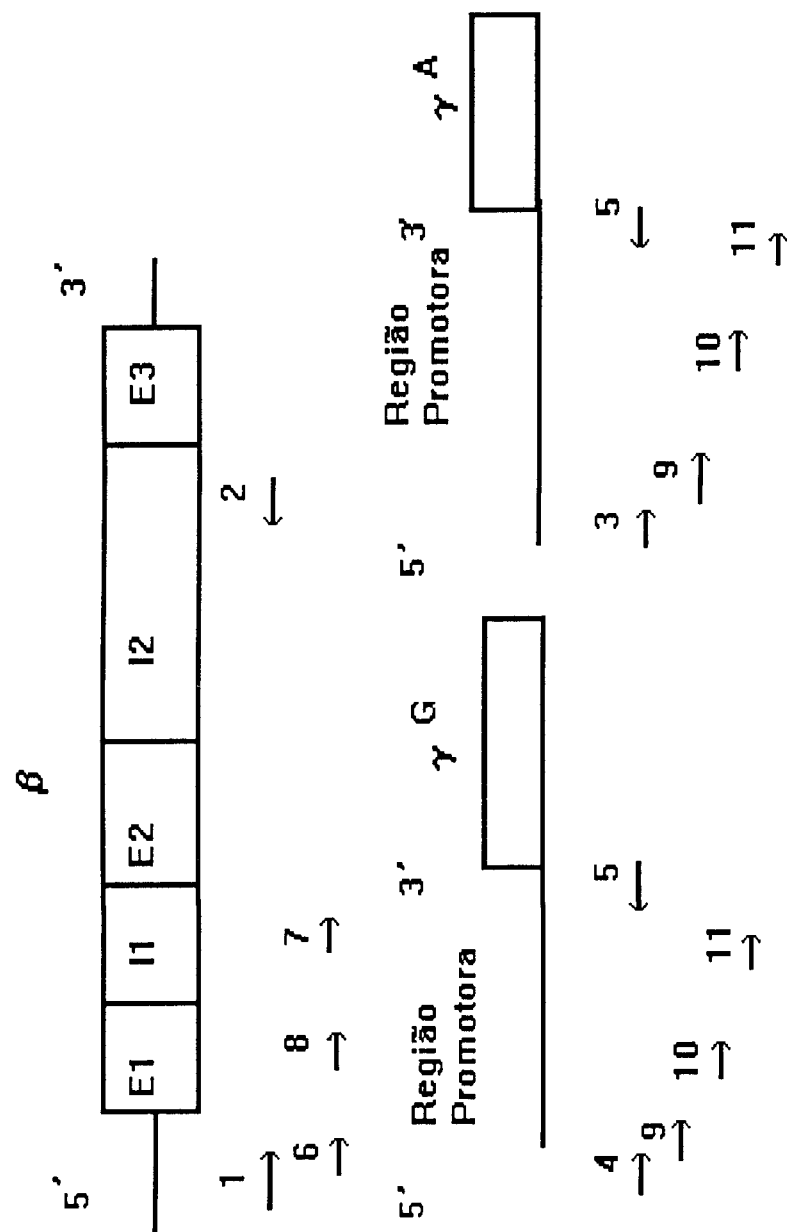


Figura 8. Localização dos *primers* utilizados na amplificação e sequenciamento dos genes β e γ .

Tabela 5. *Primers* utilizados na determinação do ponto de quebra das deficiências gênicas e *Dot-Blot*

Sequências(5'→3')	Localização
Ponto de quebra PHHF-1	
ACAGTGTGCAGTGATTATT (12)	Região RIH
CTAGAGAGAAGGAACTGCTA (13)	posição 72 a 90 da região 3D
Ponto de quebra PHHF-2	
ATATATGAAATGCTACTGATTTTG(14)	$\psi\beta$
GAACAGAAGTTGAGAGATAGAG (15)	Família L1- 3' após o gene β
<i>Dot-Blot</i> γ^A- 195 (C→G)	
GTTTTCACT <u>A</u> CACTATTGA(Normal) (16)	posição -597 a -579 γ^A
GTTTTCACT <u>G</u> CACTATTGA (Mutante) (17)	posição -597 a 579 γ^A

produtos da reação foram separados em gel de agarose 1% em tampão TAE, corado com brometo de etídio e visualizado sob iluminação ultravioleta.

B. DOT-BLOT

B.1. IMOBILIZAÇÃO DO DNA AOS FILTROS DE NYLON

40 μ l do DNA proveniente da amplificação simétrica foram desnaturados pela adição de 40 μ l de NaOH 4M/ EDTA 0,25 mM e 320 μ l água deionizada estéril. Após incubação de 1h a temperatura ambiente, a mistura foi aplicada em volumes iguais a duas membranas de nylon, utilizando-se sistema para *Dot-Blot* (*Bio-Rad*) e fixado por aquecimento em estufa a 81°C por 2hs (Yang *et al*, 1988).

B.2. MARCAÇÃO DAS SONDAS

O final 5' das sondas foi marcado com γ dATP fósforo 32 (*Inc Biomedicals-Radiochemicals Division*), utilizando-se a *T₄ polinucleotídeo quinase*. A 50pmol da sonda foram adicionados 5 μ l do tampão da enzima 10X concentrado (Tris-HCl pH 7,0- 0,5M, MgCl₂ 100mM, β -mercaptoetanol 100mM), 1 μ l do γ dATP fósforo 32 (7.000 Ci/mMols- numa concentração de 160 mCi/ml), 2 μ l da enzima *T₄ polinucleotídeo quinase* (3 unidades/ μ l) e o volume foi completado com água até 50 μ l. Após incubação a 37°C por 1h, a sonda foi purificada em coluna G-50 (*Pharmacia*) e a percentagem de incorporação foi estimada pela medida da radioatividade.

B.3. PRÉ-HIBRIDIZAÇÃO, HIBRIDIZAÇÃO E LAVAGEM DOS FILTROS

A pré-hibridização e hibridização foram realizadas em 10ml de tampão de hibridização. Após incubação de 30 minutos à temperatura de 58°C, a sonda marcada contendo aproximadamente 3 a 10×10^7 cpm foi adicionada ao tampão de pré-hibridização•. As sondas normal e mutante foram adicionadas sempre com a mesma radioatividade em cada um dos respectivos recipientes. A hibridização foi realizada por 2hs em temperatura calculada de acordo com a fórmula geral $T_m = 4 (G+C) + 2(A+T)$, utilizando-se T_m de -3 do valor obtido.

Em seguida à hibridização, os filtros foram lavados por 30 minutos a temperatura ambiente em solução contendo 2XSSPE, 0,1%SDS e por 30 minutos a temperatura de 55°C, em solução de cloreto de tetrametilamonio (Me_4NCl 3M, Tris/HCl 80mM pH8,0, EDTA 2mM e SDS 0,1%) (Yang *et al*, 1988). Após as lavagens, os filtros foram envoltos em filme de PVC e expostos em filme *Kodak X-Omat* a temperatura ambiente, sem intensificador, ou a temperatura de -70°C, com intensificador, e revelado em processador *Kodak X-Omat M20*.

•5X SSPE [NaCl 3M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2M e EDTA 0,02M]; Denhardt's 5X (5g de Ficoll-400, 5g de polivinilpirrolone, 5g de soro albumina bovina e água deionizada para 500ml), SDS 0,5%

C.SEQUENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

O sequenciamento dos produtos obtidos na amplificação assimétrica do DNA foi realizado utilizando-se a enzima *Sequenase version 2.0* (*USB Kit*) que é uma variante da bacteriófago T7 DNA polimerase.

C.1 PURIFICAÇÃO DO DNA

O óleo remanescente do tampão de amplificação foi retirado em parafilme. Após esta etapa, o DNA foi purificado por precipitação com isopropanol . O precipitado foi lavado em etanol 85% e diluído proporcionalmente em água deionizada estéril.

C.2 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

A reação compreende basicamente de três etapas: primeiro o pareamento do *primer* ao DNA purificado no item C.1; a seguir, a síntese da hélice complementar que utiliza concentrações limites de deoxinucleosídeos trifosfatos, incluindo a marcação radioativa com o α enxofre 32-dATP (deoxiadenosina 5' [α -tio] trifosfato) com atividade específica de 1325 Ci/mMol, a enzima *sequenase*, e por último a adição dos dideoxinucleotídeos trifosfatos que provocam a terminação das cadeias que estão sendo sintetizadas.

A cerca de 50pmol do *primer* foram adicionados 2 μ l do tampão 5X concentrado (Tris/HCl pH7,5 200mM, MgCl₂ 100mM, NaCl 50mM), e 7 μ l do DNA purificado. A reação foi incubada por 3 minutos a 67°C e imediatamente colocada em gelo.

À mistura *primer*-DNA foram adicionados 2µl de Ditioneitol (DTT) 0,1M, 2µl a mistura de deoxinucleosídeos trifosfatos diluídos a 1:8 (dGTP 7,5µM, dCTP 7,5µM, dTTP 7,5µM), 0,5µl de α enxofre 35 -dATP e 2µl da enzima *sequenase* diluída a 1:8 (2 unidades). A reação foi incubada por 3 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, cerca de 3,5µl da mistura foram distribuídos em 4 tubos contendo 2,5µl de cada 2'3'- dideoxinucleotídeos 5'-trifosfatos (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) e aquecidos a 37°C. Os dideoxinucleotídeos realizam a interrupção das hélices que estão sendo sintetizadas durante a reação de marcação. As reações foram interrompidas após incubação a 37°C (3 minutos) pela adição de 4µl de solução contendo formamida 95%, EDTA 20mM, azul de bromofenol 0,05% e xilenocianol FF 0,05%, e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 8% em tampão Tris-EDTA-Borato (Tris-0,89M, ácido bórico-0,89M e EDTA- 20mM), uréia 8M, em placas de 33X38 e 33X40cm, utilizando espaços laterais e pente de 0,4mm. A eletroforese foi realizada em aparelho de sequenciamento *Bethesda Research Laboratories life Technologies INC, model S2*, a 1.600Volts por aproximadamente 4hs.

O tampão utilizado na eletroforese foi o mesmo usado na preparação do gel. As amostras foram desnaturadas a 100°C antes de serem aplicadas ao gel. Após eletroforese, o gel foi fixado em solução de ácido acético:etanol (10:12%) e a auto-adiografia foi obtida após exposição do gel seco em filme de raio-X, sem intensificador por 16hs a temperatura ambiente.

RESULTADOS

CASO 1

Três membros desta família (pai [caso índice] e dois filhos exibiram quantidades elevadas de HbF (13,5 à 20,3%) contendo uma distribuição pancelular nas hemácias, na ausência de sintomatologia clínica. Os dados hematológicos da família estão descritos na tabela 6.

O gel de poliacrilamida-triton-uréia realizado para análise das cadeias γ da HbF revelou a predominância das cadeias γ^G , que foi posteriormente confirmado pela realização da HPLC. A quantificação das cadeias de globina revelou 91,4% de cadeias γ^G e 8,6% de cadeias γ^A (Figuras 9 e 10).

O rastreamento inicial para detecção de deleções gênicas foi levado a efeito pelo método de *Southern Blot* com o emprego das sondas γ e $\psi\beta$, que não detectaram anormalidades.

Deste modo foi realizado o sequenciamento da região promotora do gene γ^G no caso índice e no filho 3. Foram utilizados para amplificação assimétrica os *primers* números 4 e 5. Para a reação de sequenciamento foram empregados os *primers* número 9,10 e 11. Como pode ser observado na figura 11, existe uma substituição C→G na posição -202 (duas bandas na mesma posição horizontal, uma na coluna correspondente a C e outra na de G), indicando que o indivíduo é heterozigoto para essa mutação.

Esta mutação remove o sítio de reconhecimento da enzima *ApaI* (5' ...GGGCC/C...3') normalmente localizado nesta região. Assim, DNA normal amplificado com os *primers* 4 e 5, pode ser clivado pela enzima de restrição *ApaI* produzindo dois fragmentos, de 408 e 242 pares de bases (pb). Entretanto, DNA de portadores da mutação C→G na posição -202, amplificado com os mesmos *primers*, originam três fragmentos após a digestão: os dois fragmentos normais (408 e 242pb) e o fragmento intacto de 650pb (figuras 12 e 13).

No paciente estudado foi observado padrão de heterozigoto para a mutação C→G, na posição -202 da região promotora do gene γ^G (650,408 e 242pb). Desse modo, a análise de DNA por sequenciamento direto e pela digestão do fragmento amplificado com a enzima ApaI comprovam que o paciente analisado era portador em heterozigose da γ^G -PHHF-mp (C→G , -202).

Tabela 6. Dados hematológicos da família 1.

	Idade	GV	Hb	Ht	VCM	HCM	HbA2	HbF
	anos	X10¹²/l	g/dl	%	f	pg	%	%
Propósito	36	4,8	14,6	43,9	89,7	29,8	2,0	21
Filho-1	3	4,73	12,1	37,7	79,7	25,7	2,5	13,5
Filho-2	6	4,31	11,8	35,1	81,4	27,5	2,6	1,0
Filho-3	9	4,81	13,8	41,4	86,2	28,7	1,5	13,5
Filho-4	17	4,8	13,2	40,6	84,7	27,6	3,0	0,3

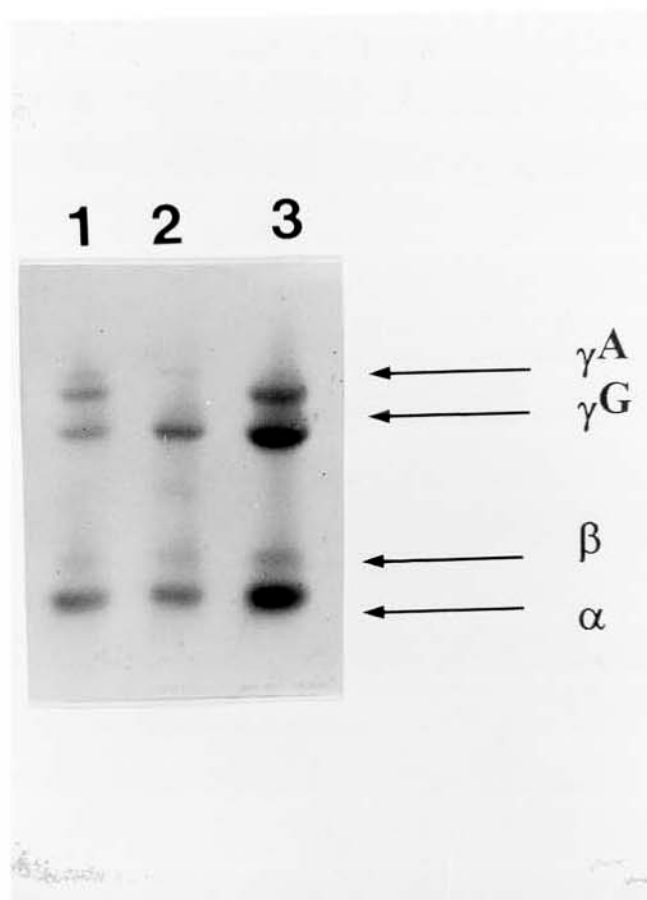


Figura 9. Padrão de bandas observado por eletroforese das cadeias de globina em gel de Poliacrilamida-Triton-Uréia. Linha 1: representa o padrão eletroforético das cadeias γ observado em adultos normais (relação entre as cadeias γ^G : γ^A de aproximadamente 4:6); Linha 2: representa o padrão eletroforético das cadeias γ observado no caso índice (quantidade maior das cadeias γ^G); Linha 3: representa o padrão eletroforético das cadeias γ observado em recém-nascido (relação entre as cadeias γ^G e γ^A de aproximadamente 7:3).

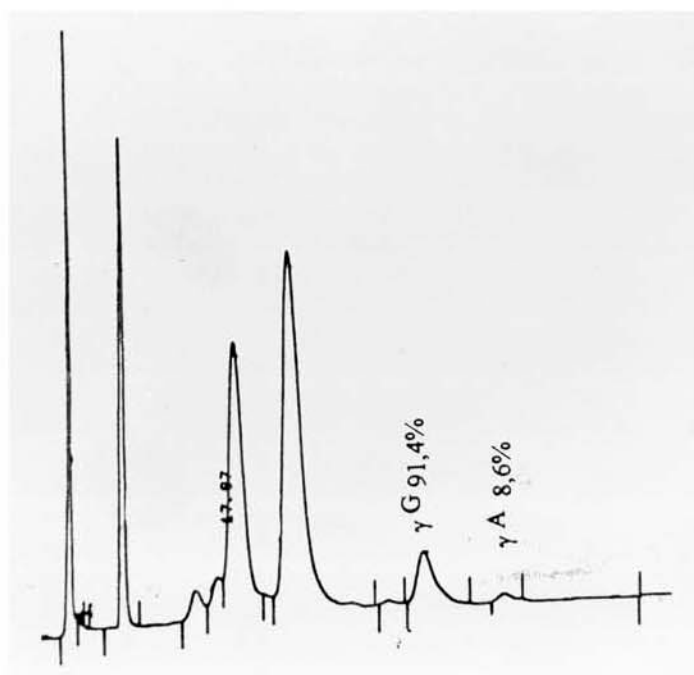


Figura 10. Representação esquemática da cromatografia líquida de alta pressão realizada no paciente portador da γ^G -HPFH (C $\rightarrow$ G, -202). Notar a presença de 91,4% da cadeia γ^G .

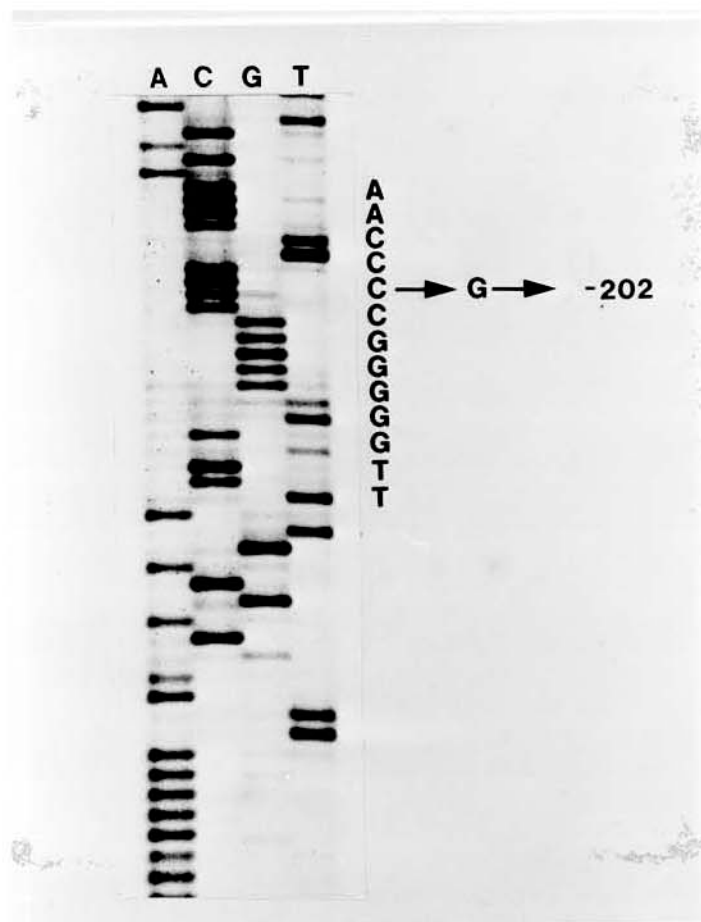


Figura 11. Auto-radiografia do gel de sequenciamento do paciente portador da γ G-PHHF-mp. Amplificação com os *primers* 4 e 5 e sequenciamento com o *primer* 10. A ocorrência de C→G na posição -202 da região promotora do gene γ^G está indicada na seta. Este dado indica a presença de dois nucleotídeos na mesma posição.

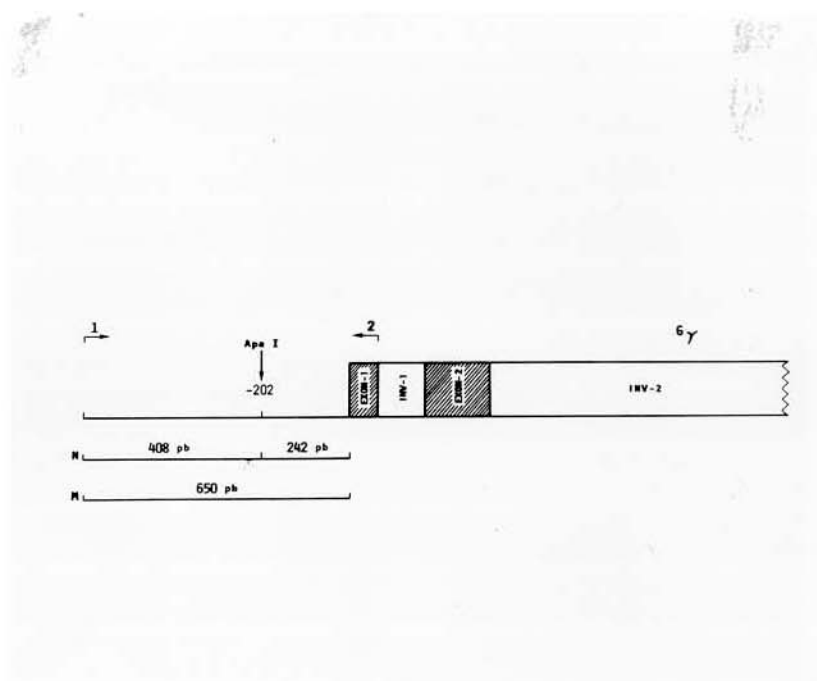


Figura 12 Representação esquemática do gene γ^G e sua região promotora, demonstrando a posição dos *primers*, bem como os tamanhos dos fragmentos amplificados antes e após a digestão enzimática no estudo realizado com a enzima *ApaI*.

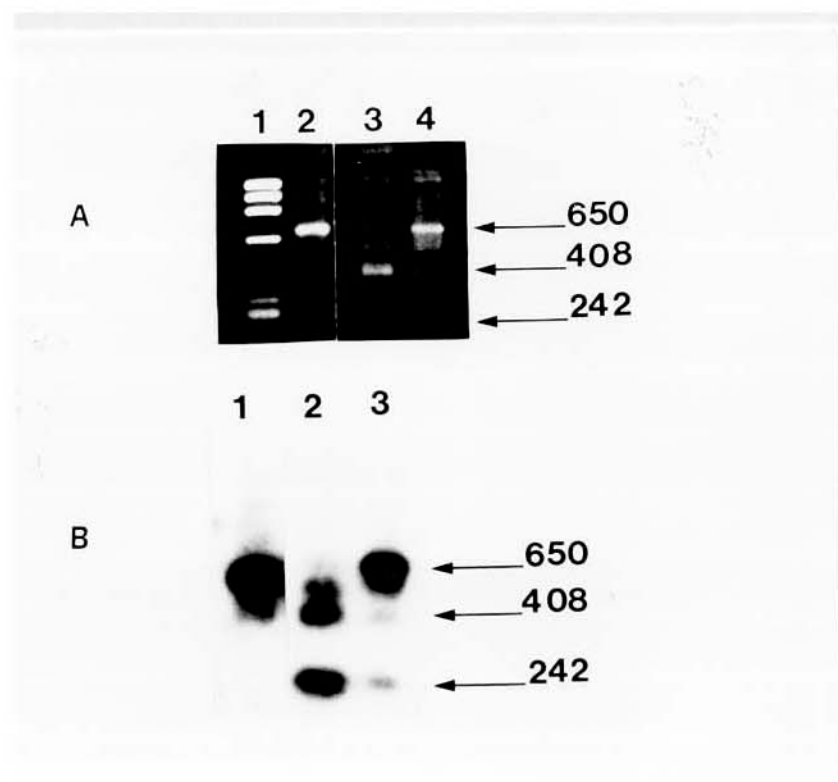


Figura 13. A. Padrão de bandas detectadas por eletroforese em agarose 0,8% de fragmentos genômicos amplificados simetricamente e digeridos pela enzima de restrição *ApaI* (1.marcaador ϕ X174; 2. controle normal não digerido; 3. controle normal digerido; 4. caso índice (γ^G -PHHF por mutação de ponto). **B.** Padrão das bandas descritas em A após hibridização com sonda específica para o gene γ .

CASO 2

O caso índice apresentou dosagem de HbF de 6,8% sem outras anormalidades hematológicas. Foram estudados mais três membros da família que exibiram níveis semelhantes de HbF. A coloração das hemácias pela técnica de Kleihauer demonstrou uma distribuição heterogênea da HbF e o estudo das cadeias γ realizado pelo gel de Poliacrilamida-Triton-uréia revelou a predominância das cadeias γ^A (Figura 14). A quantificação das cadeias γ por HPLC mostrou 73,2% de γ^A e 26,8% de γ^G . A síntese de globina para as cadeias α / não α foi balanceada e o caso índice apresentou uma relação de 1,01. O exame clínico dos indivíduos estudados não apresentou qualquer alteração. Os dados hematológicos da família estão descritos na Tabela 7.

O rastreamento inicial para a detecção de deleções gênicas foi levado a efeito pelo método de *Southern Blot* com o emprego das sondas γ e $\psi\beta$, que não detectaram anormalidades. Deste modo foi realizado o sequenciamento da região promotora do gene γ^A . Foram utilizados para a amplificação assimétrica os *primers* 3 e 5. Para o sequenciamento, os *primers* 9, 10 e 11. Como pode ser observado na figura 15, existe uma substituição C→G na posição -195 da região promotora do gene γ^A (duas bandas na mesma posição horizontal, uma na coluna C e outra na coluna G), indicando que o indivíduo é heterozigoto para essa mutação. Com o intuito de confirmar a mutação foi realizada hibridização com oligonucleotídeos alelo específicos, pela técnica de *dot-blot*, com a utilização do DNA genômico amplificado simetricamente com os *primers* 3 e 5 e hibridizados com as sondas específicas normal (*primer* 16) e mutante (*primer* 17) para a referida mutação. Como pode ser observado na Figura 16 o caso índice, os três membros da família e o controle positivo (DNA anteriormente caracterizado)apresentaram reação positiva com a sonda normal e mutante, indicando que são heterozigotos para a mutação. O controle negativo apresentou reação positiva apenas com a sonda normal.

Devido ao encontro concomitante de valores relativamente elevados da cadeia γ^G foi realizado o sequenciamento da região promotora deste gene. Foram utilizados para a amplificação assimétrica os *primers* 4 e 5. Para a reação de sequenciamento, os *primers* 9, 10 e 11. A finalidade deste estudo foi a análise da região -158. A substituição C→T nesta posição está associada a um aumento na síntese destas cadeias pela criação de um sítio de reconhecimento para a enzima de restrição XmnI. Como pode ser observado na Figura 17 existe um C na posição -158 indicando que esta região é normal.

Desse modo, a análise de DNA por sequenciamento direto e por hibridização alelo específica comprovam que o paciente analisado era portador em heterozigose da γ^A -PHHF-mp (C→G, -195).

Tabela 7. Dados hematológicos da família 2.

	idade anos	GV X10¹²/l	Hb g/dl	Ht %	VCM fl	HCM pg	HbA2 %	HbF %	γG	γA
Propósito	34	4,47	14,3	43,3	96,7	32,1	2,56	6,8	26,8	73,2
Mãe	55	4,79	14,2	44,7	93,2	29,5	3,3	4,8	33,0	67,0
Filho-1	12	5,35	13,6	42,7	79,8	25,4	2,27	6,8	29,8	70,2
Filho-2	7	4,62	13,2	40,7	88,1	28,6	2,5	11,7	30,7	69,3

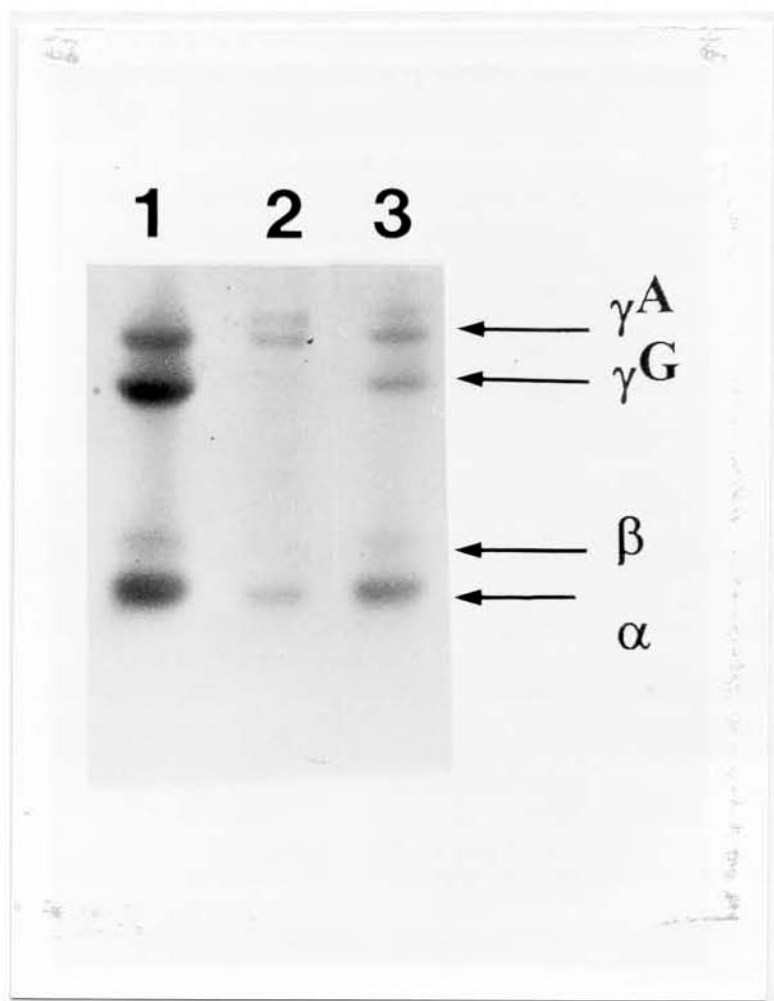


Figura 14. Padrão de bandas observado por eletroforese das cadeias de globina em gel de Poliacrilamida-Triton-Uréia. Linha 1: recém-nascido; Linha 2: caso índice (predomínio de cadeias γ^A); Linha 3: adulto normal.-

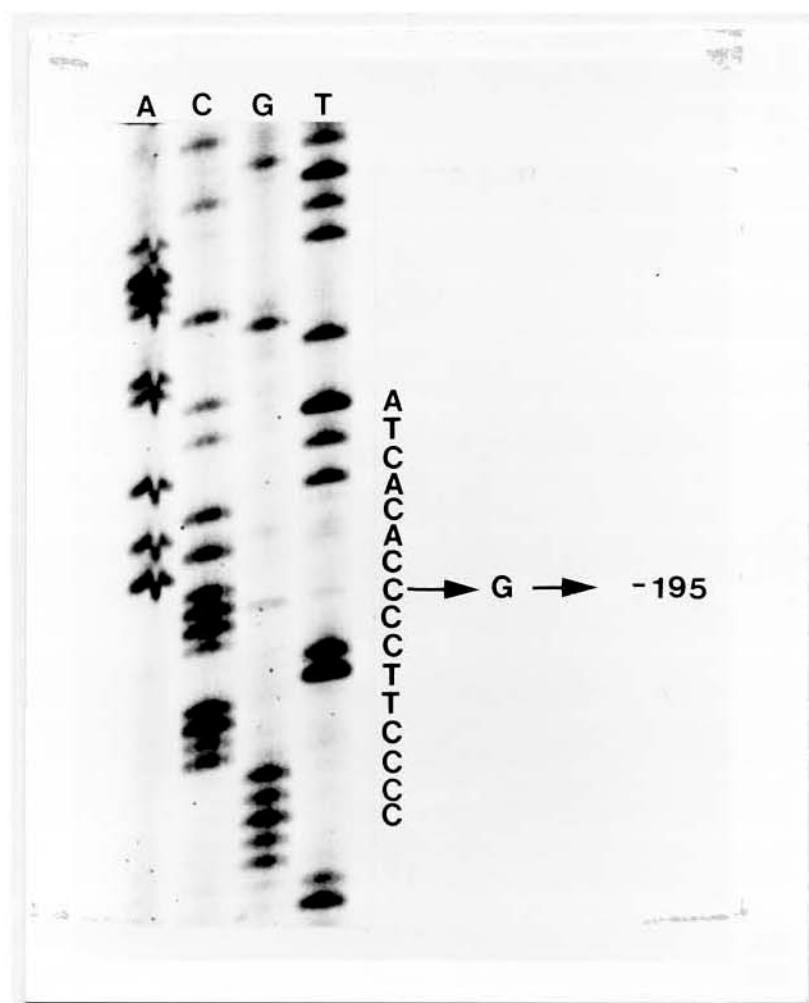


Figura 15. Auto-radiografia do gel de sequenciamento do paciente portador da γ^A -PHHF-mp. Amplificação com os *primers* 3 e 5 e sequenciamento com o *primer* 10. A ocorrência de C→G na posição -195 da região promotora do gene γ^A está indicada na seta. Este dado indica a presença de nucleotídeos na mesma posição.

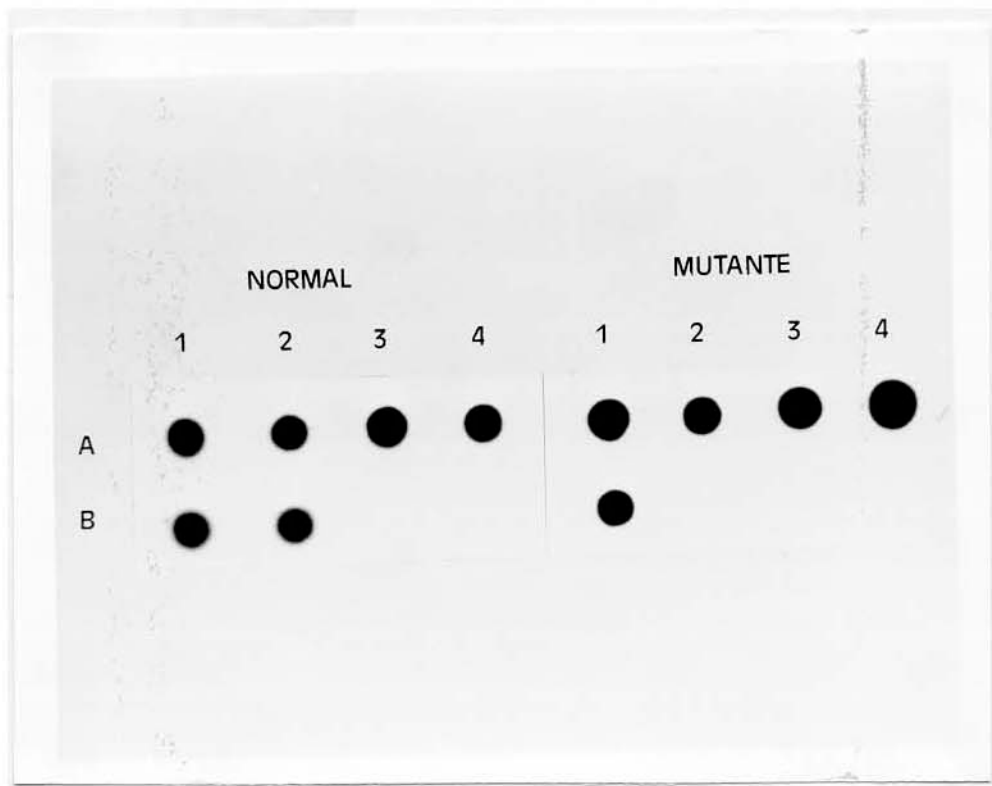


Figura 16. Hibridização alelo-específica DNA genômico do controle normal , controle positivo, caso índice e de três membros da família foram amplificados simetricamente, utilizando os *primers* 3 e 5, fixados em filtros de nylon por *Dot-Blot* e hibridizados com sondas de sequências correspondentes aos alelos normal (*primer* 14) e mutante (*primer* 15) para a mutação -195 (C→G) na região promotora do gene γ^G . Os indivíduos A1 (caso índice), A2 (mãe), A3 (filho 1), A4 (filho2) e B1 (controle positivo), apresentaram marcação positiva, com intensidade semelhante, com as duas sondas, sendo portanto, heterozigotos para a mutação. O indivíduo B2 (controle normal), apresentou marcação positiva somente com a sonda normal, indicando ausência da referida mutação.

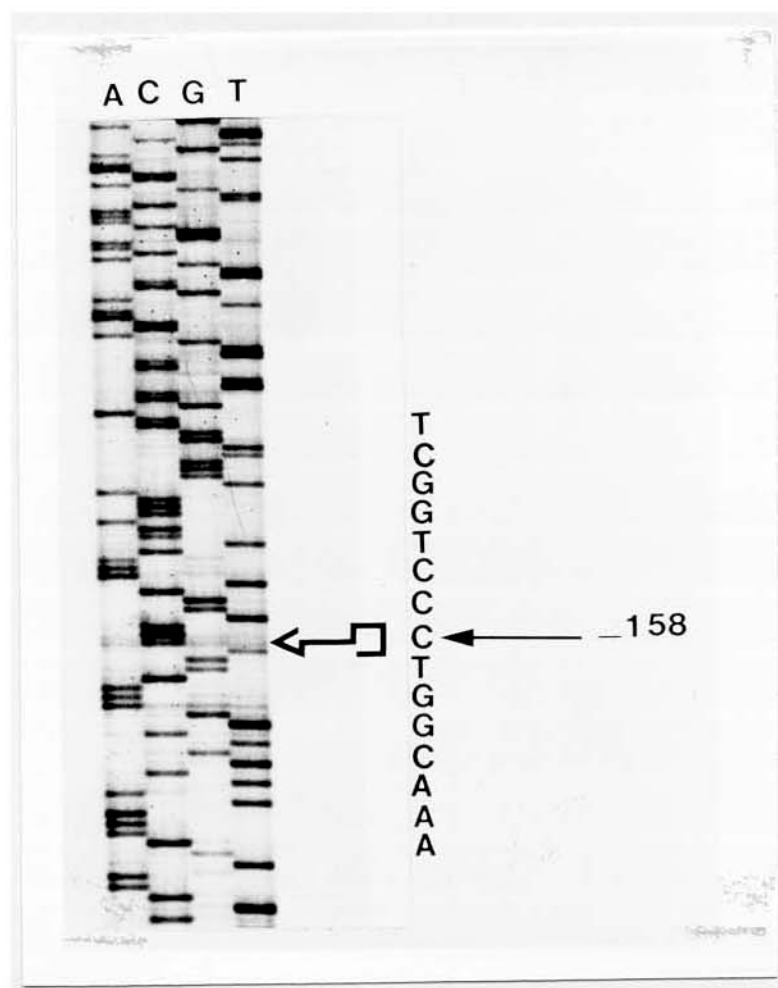


Figura 17. Auto-radiografia do gel de sequenciamento da região promotora do gene γG do paciente portador da γ^A -PHHF-mp. Amplificação com os *primers* 4 e 5 e sequenciamento com o *primer* 10. A ocorrência de apenas um C na posição -158 está indicado na seta. Este dado indica que esta região é normal.

CASO 3

O caso índice e mais quatro indivíduos desta família apresentaram valores elevados de HbF (13,8-18,3%) contendo os dois tipos de cadeia γ . As proporções de ambas as cadeias eram iguais, sem outras anormalidades hematológicas (Figura 18). Os dados hematológicos da família estão descritos na tabela 8.

O mapeamento gênico com a sonda γ e digestão com a enzima de restrição BglII mostrou fragmentos de tamanho igual ao controle (Figura 19). Estes dados indicam que a região até a posição 5' do gene $\psi\beta$ estava conservada. A hibridização com a sonda $\psi\beta$ e a enzima de restrição Eco RI mostrou fragmentos normais, indicando ausência de deleção até a região média entre os genes $\psi\beta$ e δ . Por outro lado a hibridização com a mesma sonda e a enzima Bam HI mostrou a presença de um fragmento anormal de 12,5Kb ao lado do fragmento normal de 15,5Kb (Figura 20). Este fato demonstra a perda do sítio da enzima localizada no gene δ em um alelo, isto é, há provavelmente uma deleção com ponto de quebra na posição 5' entre os genes $\psi\beta$ e δ .

O rastreamento inicial para a localizar a posição 3' da deleção com a sonda 3D revelou um fragmento anormal de 2,2Kb ao lado do fragmento anormal de 11Kb, indicando o provável ponto de quebra a uma distância de aproximadamente 95Kb 3' do gene β . Estes resultados são altamente sugestivos de deficiência gênica da PHHF do tipo 1 (Figura 21 e Tabela 9).

Com o intuito de confirmar esta deleção foi realizada amplificação do DNA com *primers* que flanqueiam a possível região de quebra, conforme descrito por Martinez *et al*, 1990 (Figura 22). As sequências desses *primers* estão descritas na tabela 5. Desse modo foi obtido um fragmento de 520pb, de acordo com os resultados previamente descritos em portadores de PHHF por deficiência gênica do tipo 1 (Figura 23). O sequenciamento do ponto de quebra da deficiência gênica foi realizado após amplificação assimétrica com os *primers* acima citados e sequenciado com o *primer*

localizado na posição 3D. A sequência de nucleotídeos e a inserção de 5 nucleotídeos AAATA confirmou o ponto de quebra e caracterizou a deleção como uma PHHF do tipo 1 (Figura 24 e 25).

Tabela 8. Dados hematológicos da família 3.

	Idade	GV	Hb	Ht	VCM	HCM	HbA2	HbF
	anos	X10¹²/l	g/dl	%	fl	pg	%	%
Propósito	50	5,76	15,4	48,3	84,3	26,7	1,99	13,9
esposa	50	5,28	15,5	47,4	89,8	29,3	3,3	0,91
Filho-1	28	6,25	16,7	52,6	84,1	26,1	2,45	18,3
Filho-2	24	5,44	14,1	45,6	83,8	25,9	2,19	13,8
Filho-3	11	5,01	12,7	40,4	80,6	25,4	2,63	0,61
Filho-4	10	4,86	12,4	39	80,2	25,5	2,64	18,3



Figura 18. Padrão de bandas das cadeias γ observado por eletroforese em Poliacrilamida-Triton-Uréia no portador em heterozigose da PHHF por deficiência gênica do tipo 1. Linha 1: adulto normal; Linha 2: caso índice (quantidades equivalentes de ambas as cadeias); Linha 3: recém-nascido.

Tabela 9. Fragmentos de DNA observados no mapeamento gênico da amostra de DNA do caso 3.

Probe	Enzima	Tamanho dos fragmentos (Kb)	
		DNA controle	DNA do paciente
γ	Bgl II	13	13
$\psi\beta$	EcoRI	7,2	7,2
	Bam HI	15,5	12,5; 15,5
3D	EcoRI	11	2,2; 11

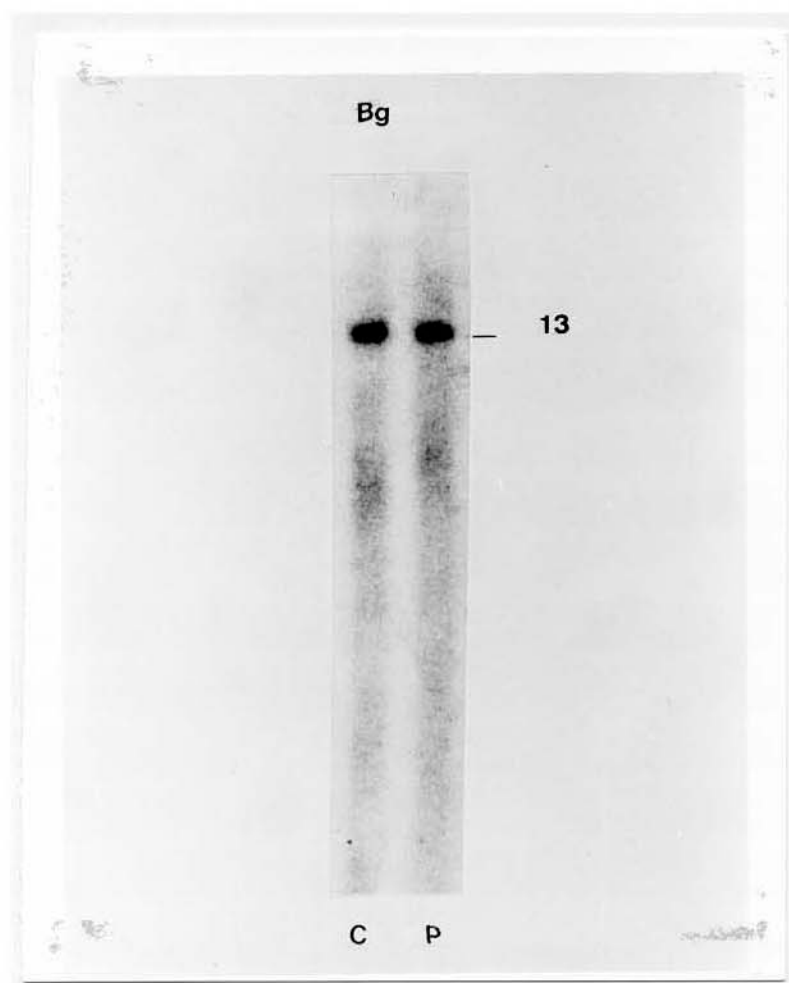


Figura 19. Auto-radiografia do *Southern Blot* realizado em DNA controle normal e caso índice de número 3 com as sondas γ e a enzima BglII (Bg). Não houve formação de fragmento anormal, indicando que esta região não foi atingida pela deficiência.

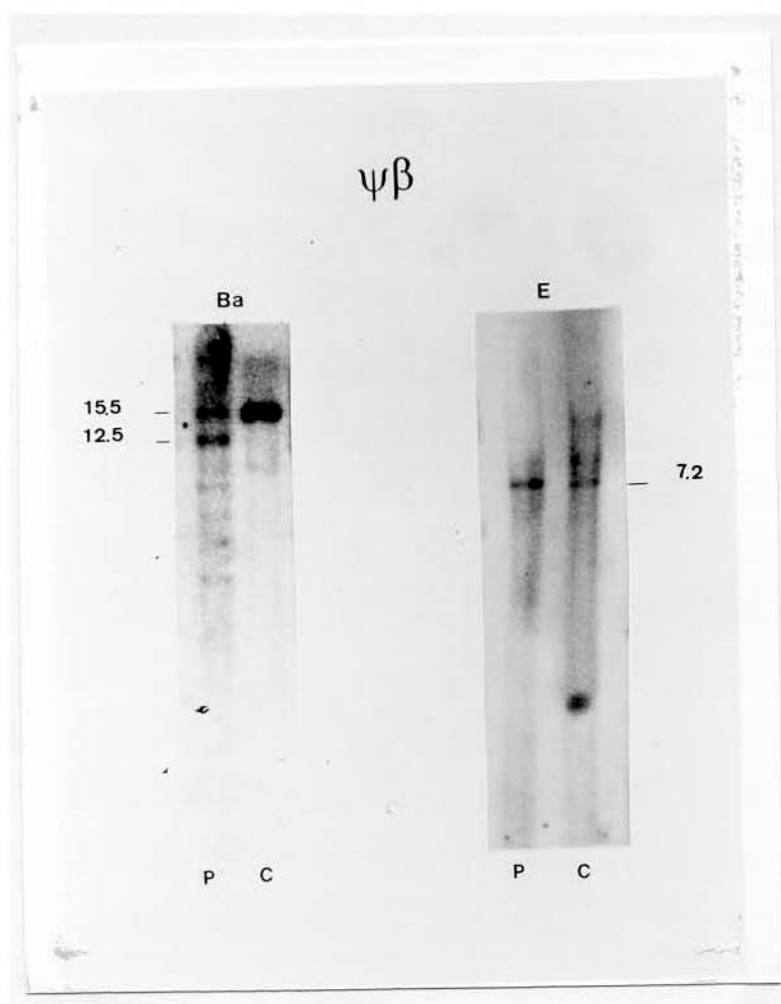


Figura 20. Auto-radiografia do *Southern Blot* realizado em DNA controle normal e do caso índice de número 3 com a sonda $\psi\beta$ e as enzimas de restrição BamHI (Ba) e EcoRI (E). Notar a presença de banda com padrão diferente do normal com a enzima Ba (12,5kb)

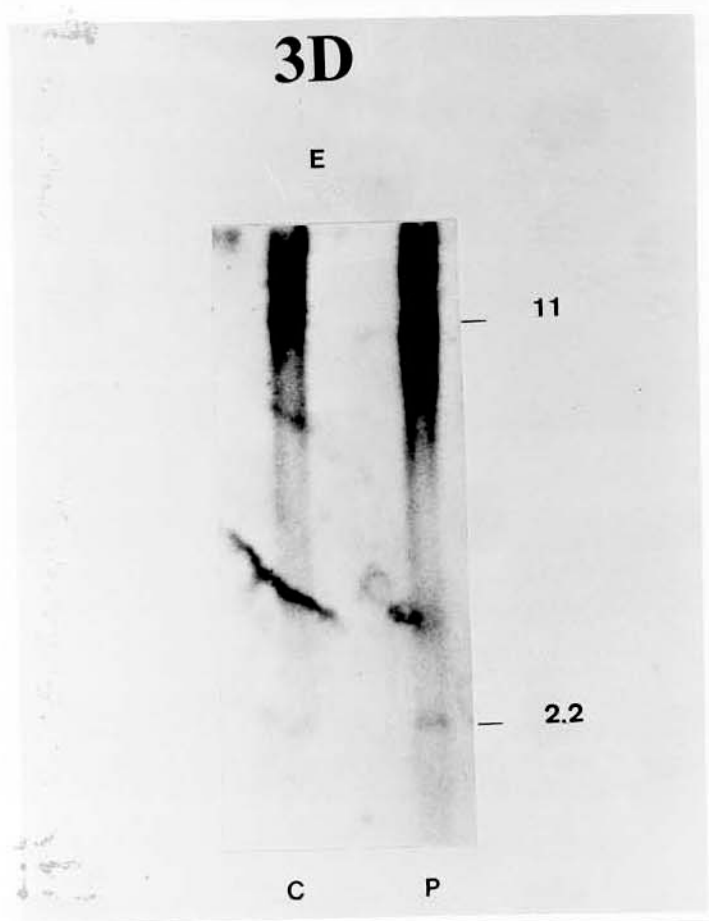


Figura 21. Auto-radiografia do *Southern Blot* realizado em DNA controle normal e caso índice de número 3 com a sonda 3D e a enzima de restrição E. Notar a presença de banda com padrão diferente do normal (2.2kb).

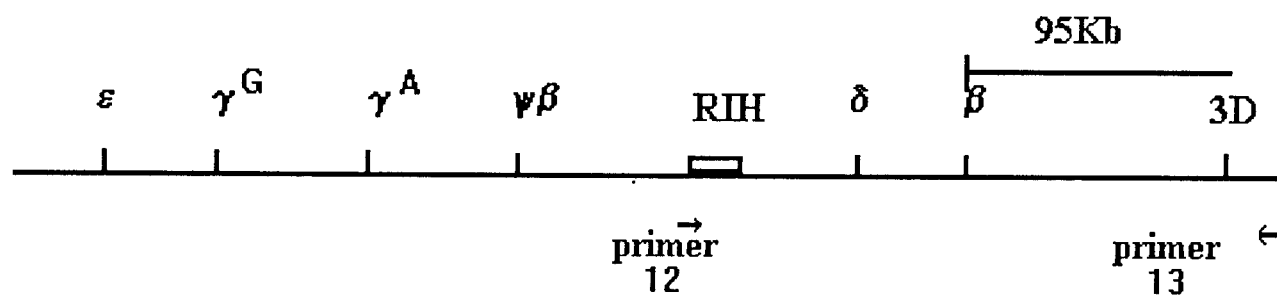


Figura 22. Representação esquemática da localização dos *primers* 12 e 13, utilizados na confirmação da deleção gênica encontrado no caso índice do portador de PHHF do tipo 1.



Figura 23. Padrão de bandas observado por eletroforese em agarose 0,8% de fragmentos de DNA genômico amplificados simetricamente com os *primers* localizados nas regiões RIH e 3D para a demonstração da deleção na PHHF-dg do tipo 1. Linha 1. Marcador ϕ X174 HaeIII. Linha 2. Fragmento amplificado do DNA do caso índice (520 pb). Linha 3. fragmento amplificado do DNA controle positivo.

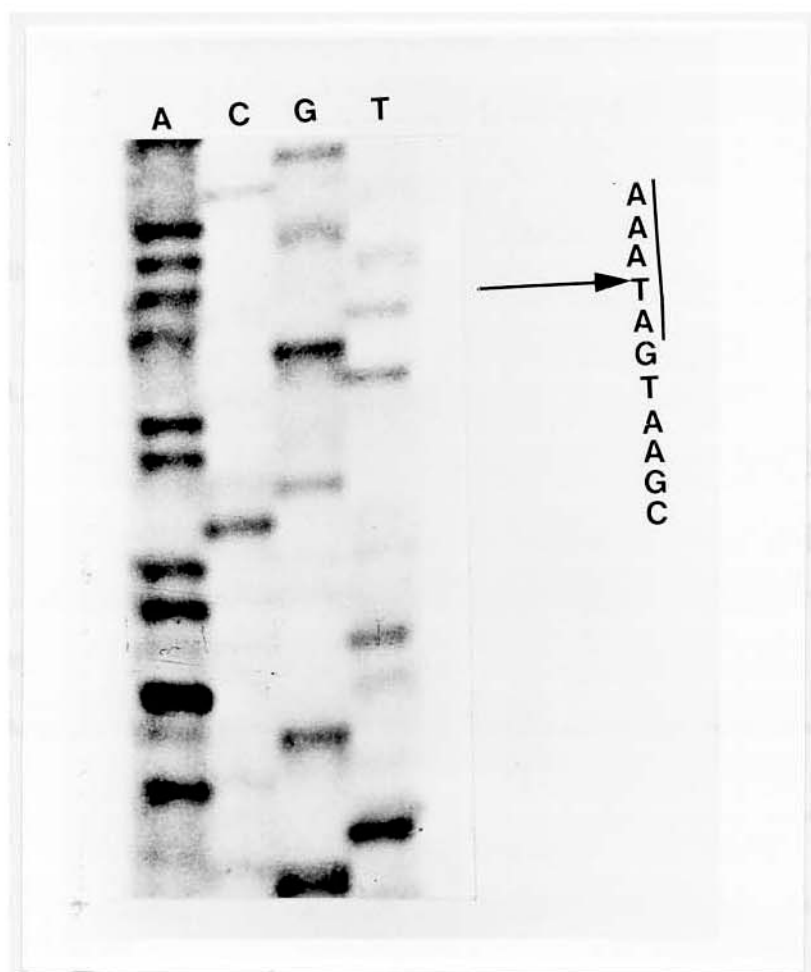


Figura 24. Sequenciamento do fragmento de DNA do portador de PHHF-dg do tipo 1, amplificado com os *primers* localizados nas regiões 12 e 13 e sequenciamento com o *primer* 13. A inserção de 5 nucleotídeos AAATA encontrada no ponto de quebra para este tipo de condição encontra-se representada.

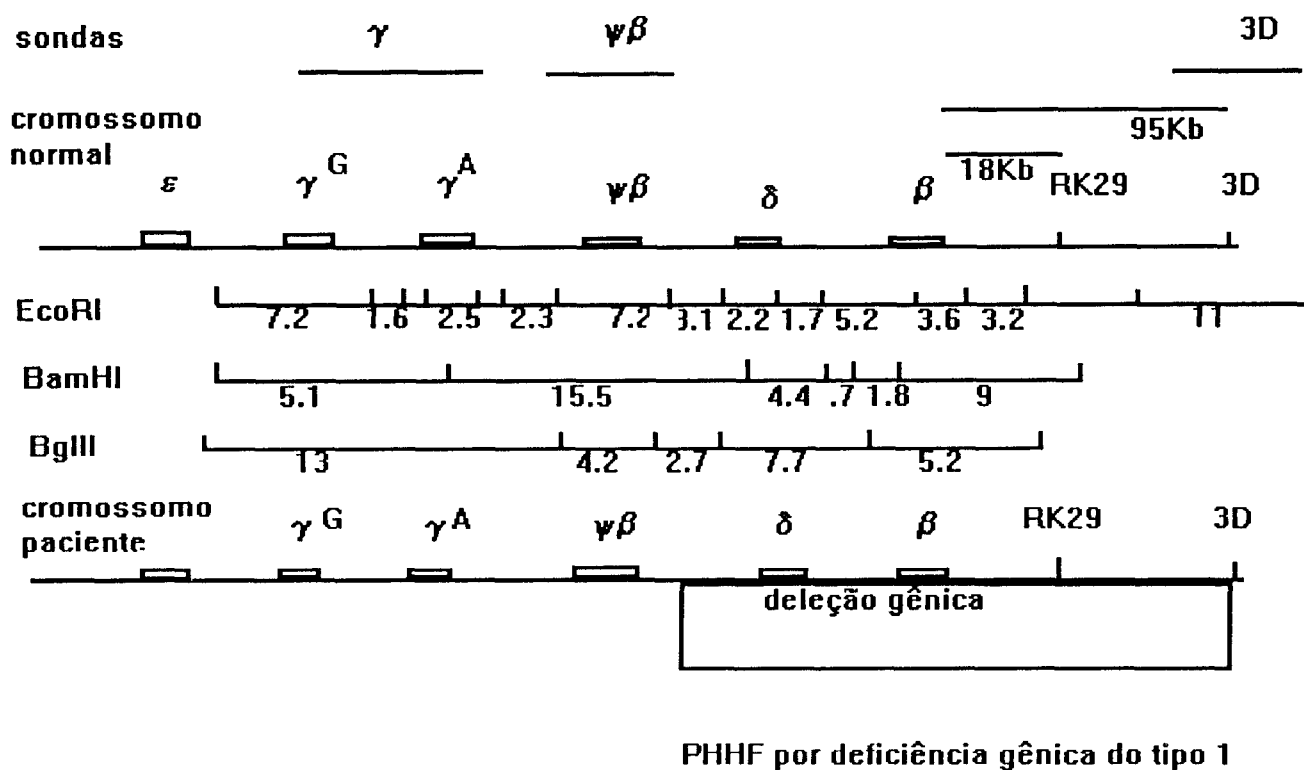


Figura 25. Representação esquemática das bandas normais detectadas no mapeamento gênico do grupo de genes β para as enzimas de restrição EcoRI, BglII e BamHI no caso índice de número 3.

CASO 4

A eletroforese de hemoglobina do caso índice desta família mostrou apenas HbA2 e HbF (97%). A separação de cadeias em gel de poliacrilamida-triton-uréia demonstrou a presença de cadeias γ^G e γ^A em proporções semelhantes à esperada na vida adulta (Figura 26). A análise dos dados hematológicos e de eletroforese de hemoglobina do caso índice e familiares (tabela 10) indica tratar-se de uma associação entre talassemia β e PHHF. O pai e o irmão 1 são portadores clássicos de heterozigose para tal- β , ao passo que a mãe e o irmão 2 são portadores em heterozigose para a PHHF.

1. Identificação da alteração molecular do alelo talassêmico

Com o objetivo de identificar a mutação talassêmica foi conduzido o sequenciamento completo do gene β do caso índice. A única anormalidade detectada foi a substituição C→G no *intron* 1 nucleotídeo 5 (IVSI-5), como pode ser observado na figura 27. Importa notar que essa mutação não ocorre em heterozigose, o que indica existir deleção do outro alelo β .

2. Caracterização da deficiência gênica associada a PHHF.

O mapeamento do complexo dos genes β mostrou anormalidades detectáveis com as sondas γ (Figura 28), $\psi\beta$ (Figura 29) e 3D (Figura 30). As hibridizações com as sondas 5' δ e RK29 apresentaram padrão de bandas normais, embora com menor intensidade que os controles, sugerindo que estes genes estão presentes em proporção menor do que o controle, devido a deficiência gênica. Por outro lado a hibridização com a sonda ϵ apresentou padrão de bandas com intensidades semelhantes, sugerindo que a deficiência não atinge essa região. (Figura31).

Com a sonda γ foram observados fragmentos anormais de 14 e 12 Kb com digestão pelas enzimas BamHI e XbaI, enquanto que o padrão foi normal com as

enzimas PstI e BglII (Bg). Com a sonda $\psi\beta$ foram evidenciadas bandas anormais com as enzimas BglII, PstI e BamHI. Esses dados indicam que o ponto de quebra da região 5' deve estar localizado na direção 3' após o sítio da enzima PstI que está localizado na *IVS2* do gene $\psi\beta$.

O ponto de quebra na região 3' foi possível de ser identificado pela hibridização com a sonda 3D e digestão com a enzima PstI, onde foi observado uma banda anormal de 14Kb juntamente com a banda normal de 13Kb. As digestões com as enzimas BamHI e BglII apresentaram padrões normais (tabela 11).

Com o intuito de confirmar esta deleção, foi realizada amplificação do DNA com *primers* que flanqueiam a possível região de quebra (Figura 32). As sequências desses *primers* estão descritas na tabela 5. Desse modo, foi obtido um fragmento menor que 100 pb, de acordo com a Figura 33. O ponto de quebra da deficiência gênica foi estabelecido após amplificação e sequenciamento com os *primers* acima citados. A sequência de nucleotídeos encontrada, estava de acordo com a descrita por Henthorn *et al* (1990) (Figura 34), sendo compatível com a PHHF do tipo 2 (Tuan *et al*, 1980), uma deleção de aproximadamente 100Kb compreendendo desde o segundo *intron* do gene $\psi\beta$ até aproximadamente 90Kb após a posição 3' do gene β .

Desse modo, o paciente é portador da associação entre talassemia- β (C→G, *IVS1-5*) e a PHHF por deficiência gênica do tipo 2. (Figura 35).

Tabela 10. Dados hematológicos da família 4.

	GV	Hb	Ht	VCM	HCM	HbA	HbA2	HbF
	X10¹²/l	g/l	%	f	pg	%	%	%
propósito	3,65	9,4	32	87,7	25,7	-	3,0	97
pai	5,4	10,6	35	64,8	19,6	94,5	4,1	1,0
mãe	4,2	12,1	37	88,1	28,8	77,9	2,1	20
irmão-1	5,6	12,4	35	63,7	20,4	94,5	4,5	1,0
irmão-2	4,5	13,5	39	86,7	30	75,6	2,0	22,4

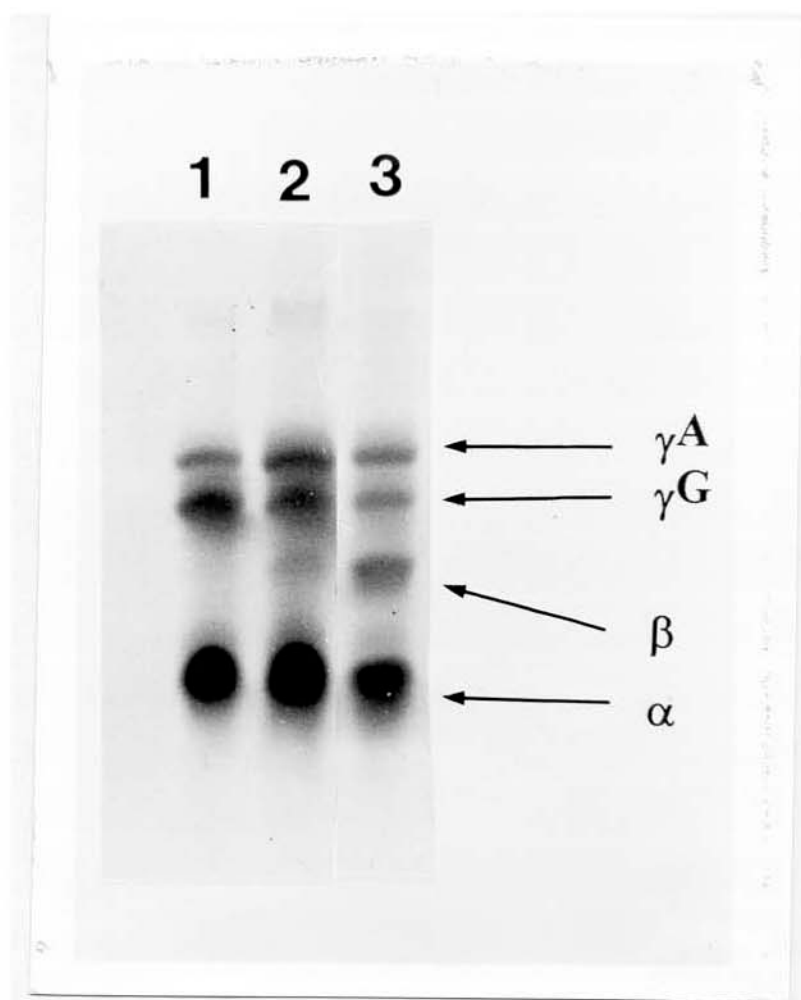


Figura 26. Padrão de bandas observado na eletroforese de Poliacrilamida-Triton-Uréia. Linha 1: Recém-nascido.; Linha 2: caso índice (Notar a presença de um padrão próximo ao do adulto normal). Linha 3: Adulto normal.

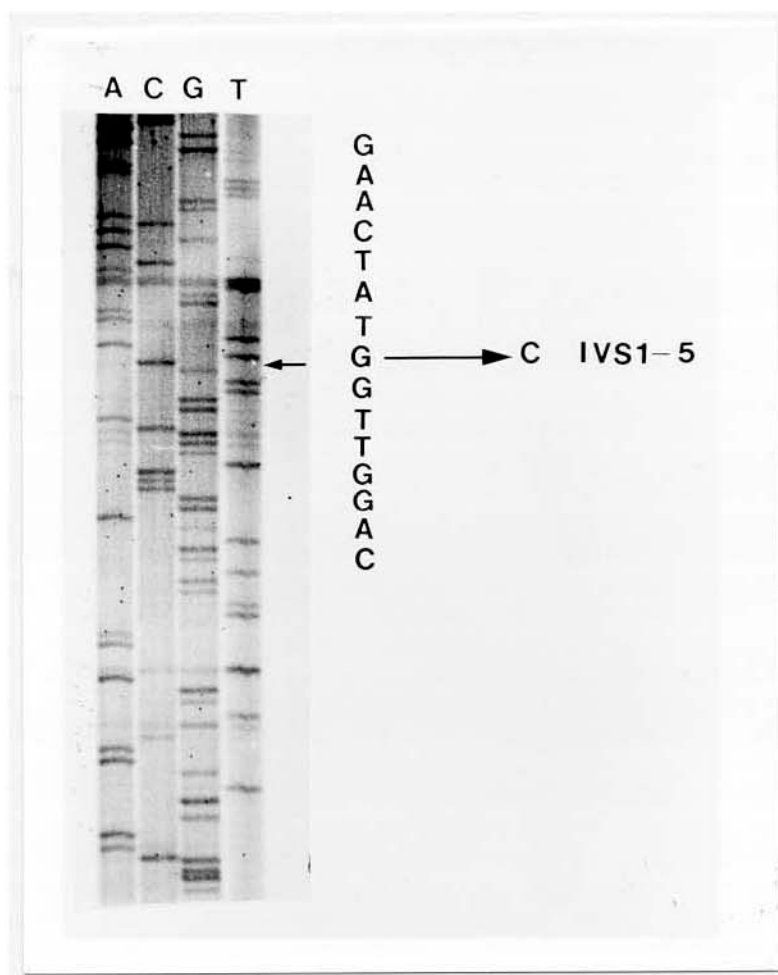


Figura 27. Auto-radiografia do gel de sequenciamento do paciente portador da Tal- β /PHHF por deficiência gênica do tipo 2. Amplificação com *primers* 1 e 2 e sequenciamento com o *primer* 7. A ocorrência de C $\rightarrow$ G na posição 5 da IVS1 do gene β está indicado na seta. Notar que ocorre somente a presença do G nesta posição sugerindo que existe deleção do gene β no outro cromossomo.

Tabela 11. Fragmentos de DNA observados no mapeamento gênico da amostra de DNA do caso 4.

Probes	Enzimas	Tamanho dos fragmentos (Kb)	
		DNA do controle	DNA do paciente
γ	BamHI	15,5; 5,1	15,5; 14; 5,1
	PstI	5,1; 4,0; 0,9	5,1; 3,9; 0,9
	XbaI	7,5; 5,1; 3,7	12; 7,5; 5,1; 3,7
	Bgl II	13	13
$\psi\beta$	BamHI	15,5	15,5; 14
	PstI	3,8	3,8; 15,5
	BglII	4,0	4,0; 0,9
ϵ	BamHI	13	13
	PstI	4;0,8	4;0,8
	BglII	10,5	10,5
5' δ	BamHI	15,5	15,5
	PstI	4,8	4,8
	BglII	7,7	7,7
RK29	BamHI	16;18	16
	PstI	9	9
	BglII	2,5	2,5
3D	PstI	13	13; 14

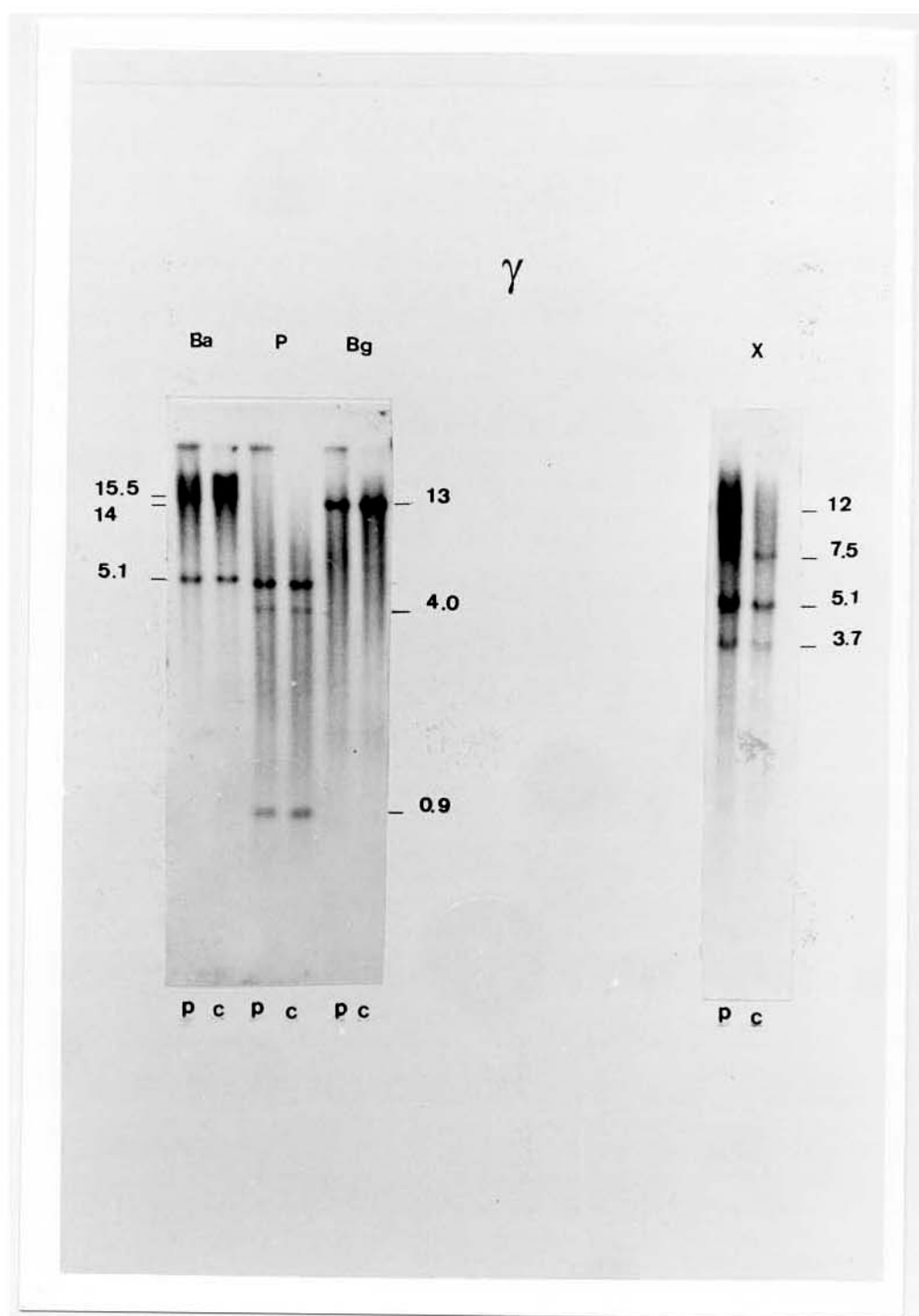


Figura 28. Auto-radiografia do *Southern Blot* realizado em DNA normal (C) e do caos índice de número 4 (P), digeridos com as enzimas de restrição Ba, P, Bg, X e hibridizados com a sonda γ . Notar a presença de bandas com padrão diferente do normal com as enzimas Ba (14Kb) e X (12Kb).

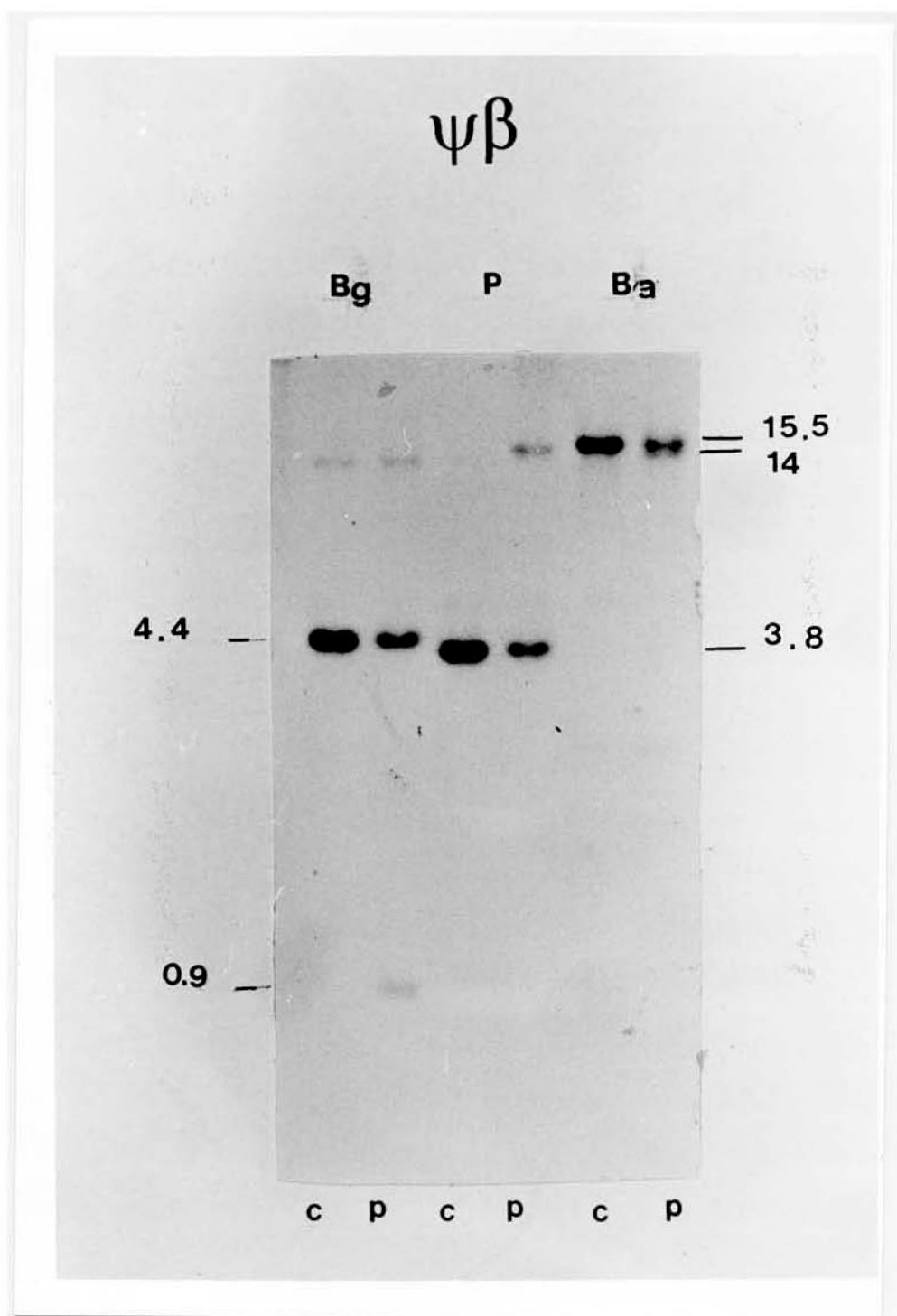


Figura 29 Auto-radiografia do *Southern Blot* realizado em DNA normal (C) e do caso índice de número 4 (P), digerido com as enzimas de restrição Ba, P e Bg e hibridizados com a sonda $\psi\beta$. Notar a presença de bandas com padrão diferente do normal com as enzimas Bg (0,9Kb), P (15,5 Kb), Ba (14Kb).

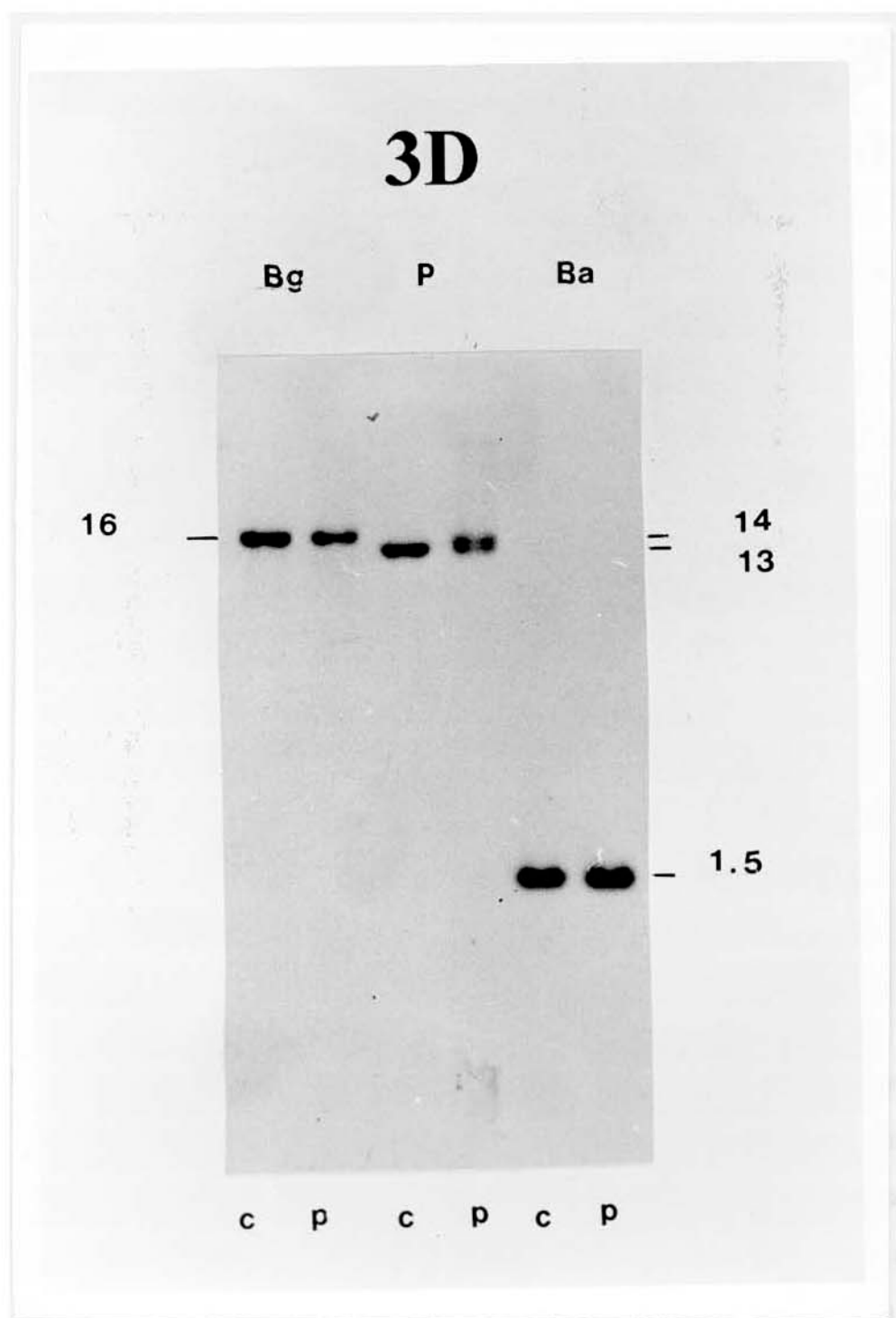


Figura 30. Auto-radiografia do *Southern Blot* realizado em DNA normal e do caso índice de número 4, digerido com as enzimas de restrição Ba, P e Bg e hibridizado com a sonda 3D. Notar a presença de banda com padrão diferente do normal com a enzima Ba (14kb).

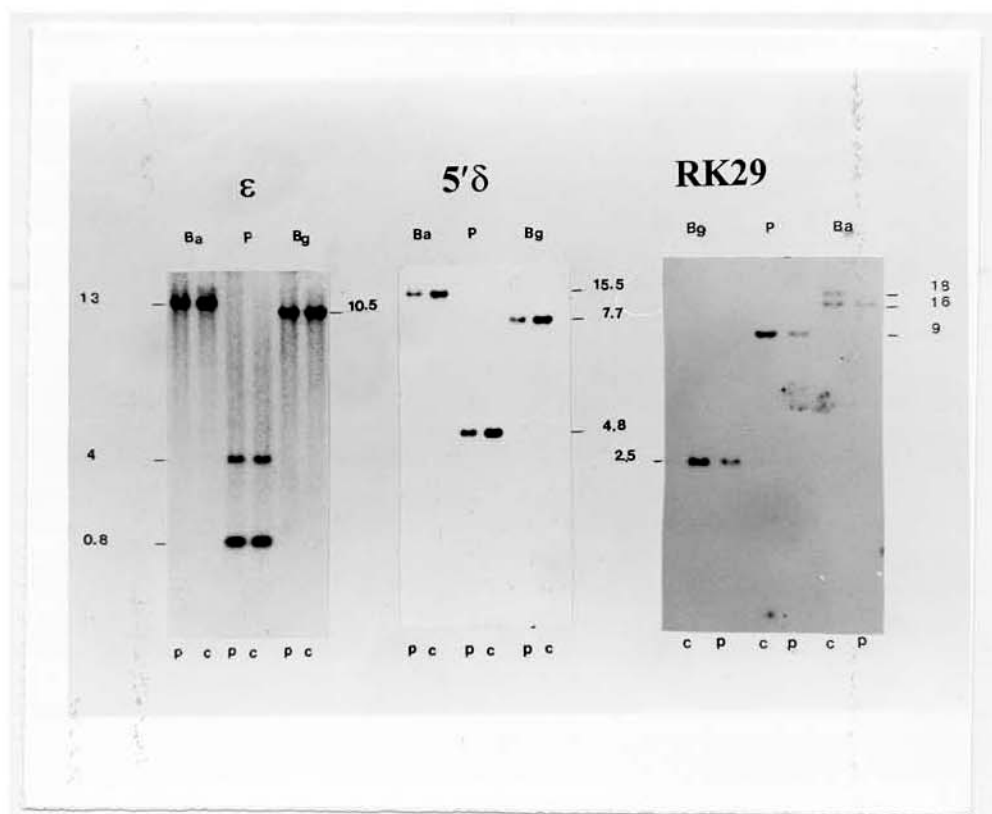


Figura 31. Auto-radiografia do *Southern Blot* realizado em DNA normal (C) e do caso índice de número 4 (P), digerido com as enzimas *Ba*, *P* e *Bg* e hibridizados com as sondas ϵ , $5'\delta$ e RK29. Notar a presença de bandas com padrão normal no C e P na hibridização com a sonda ϵ e bandas com metade da intensidade no P, nas hibridizações com as sondas $5'\delta$ e RK29, demonstrando que a região localizada nas proximidades do gene ϵ não foi atingida pela deficiência e que as regiões localizadas nos genes δ e na região RK29 (18 Kb após a posição 3' do gene β) foram deletadas.

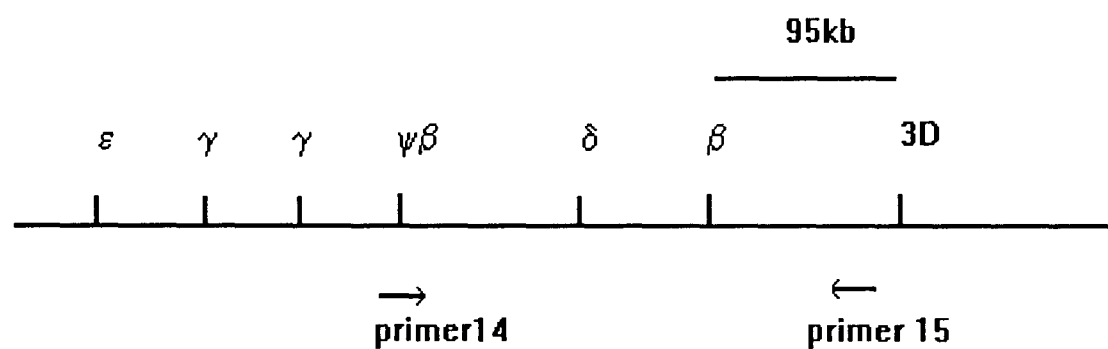


Figura 32. Representação esquemática da localização dos *primers* 14 e 15, utilizados na confirmação da deleção gênica encontrada no caso índice do portador de PHHF do tipo 2.

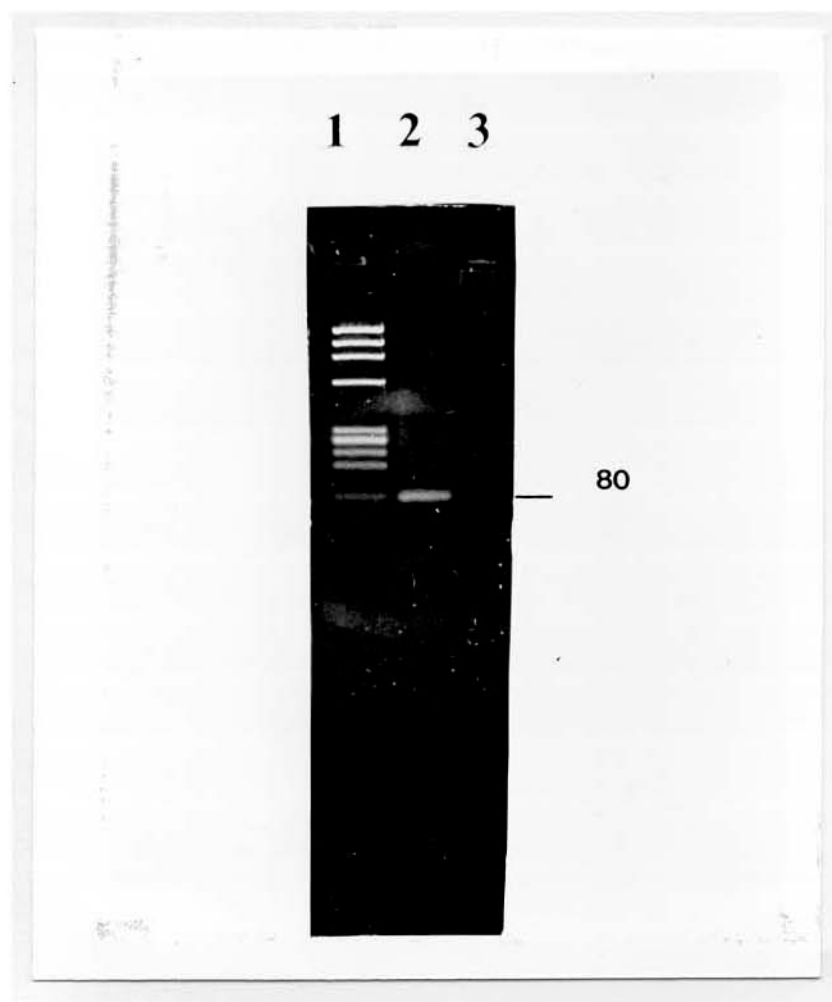


Figura 33. Padrão de bandas observado por eletroforese em agarose 0,8% de fragmentos de DNA genômico amplificados com os *primers* 14 e 15 para a demonstração da deleção na PHHF do tipo 2. Linha 1. Marcador ϕ X174 HaeIII.; linha 2. fragmento amplificado do DNA do caso índice (80pb) e linha 3. DNA controle negativo, onde não ocorreu amplificação.

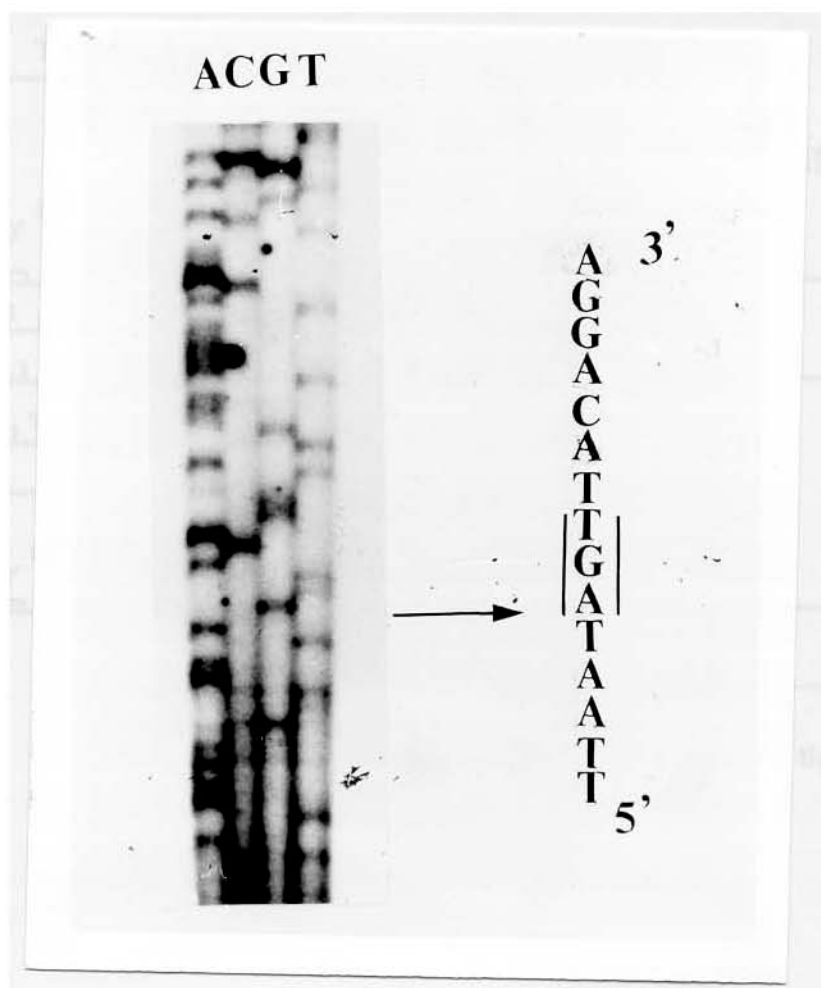
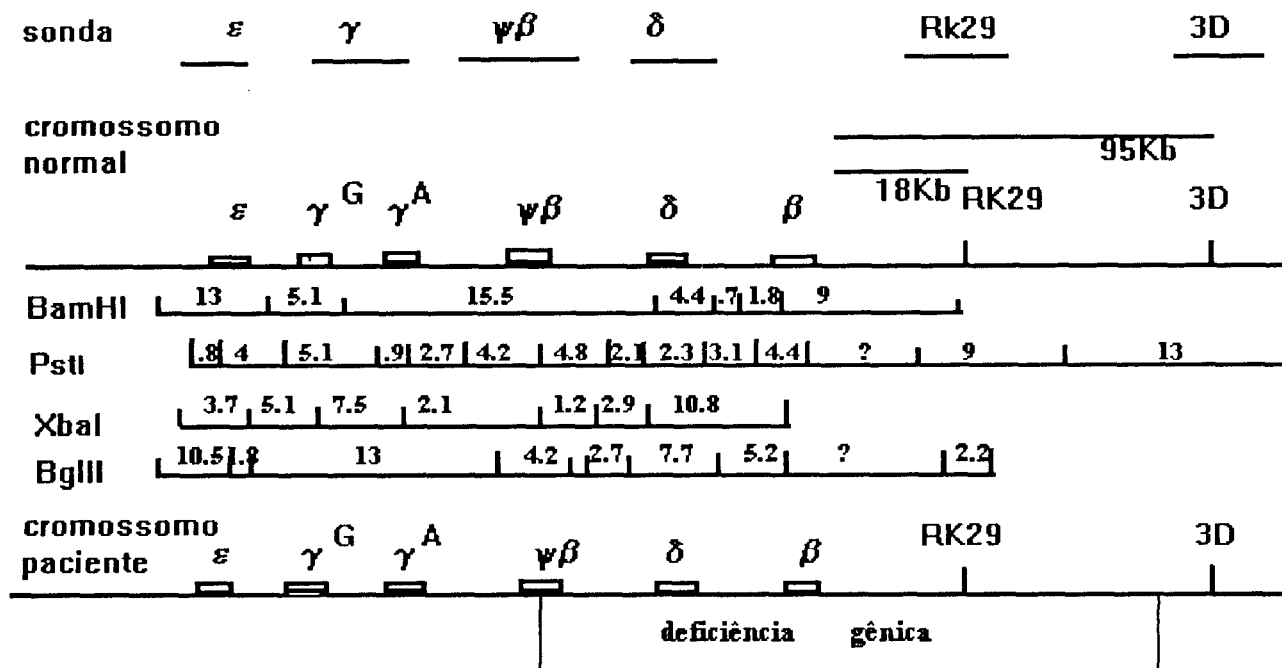


Figura 34 Sequenciamento do fragmento de DNA do caso índice portador de PHHF por deficiência gênica do tipo2, amplificado com os *primers* 13 e 14 e sequenciado com os referidos *primers*. A sequência AGT representa o ponto de junção entre as posições 5' e 3' da deleção.



PHHF por deficiência gênica do tipo 2

Figura35. Representação esquemática das bandas detectadas no mapeamento do grupo de genes β para as enzimas de restrição BamHI, BglII, PstI e XbaI no caso índice de número 4.

CASO 5

A eletroforese de Hb do caso índice desta família mostrou a presença de 2,2% de HbA2 e de 70% de HbF. A separação de cadeias em gel de poliacrilamida-triton-uréia demonstrou uma proporção aproximadamente igual de ambas as cadeias γ (Figura 36) e a quantificação das cadeias de globina por HPLC revelou 51,9% de cadeias γ^G e 48,1% de γ^A (Figura 37). A síntese de globinas para as cadeias α /não- α foi não balanceada e o caso índice apresentou uma relação de 0,37 (Costa *et al*, 1988) . A análise dos dados hematológicos e de eletroforese de hemoglobina do paciente e familiares (Tabela 12) indica tratar-se de uma associação entre talassemia β e talassemia- $\delta\beta$. O pai e os irmãos 1 e 2 apresentaram níveis elevados de HbF, com valores nos limites inferiores da normalidade de HbA2, acompanhados de microcitose e hipocromia, ao passo que a mãe é uma portadora clássica de talassemia- β .

1. Identificação da alteração molecular do alelo talassêmico

Com o objetivo de identificar a mutação talassêmica foi conduzido o sequenciamento completo do gene β do caso índice. A única anormalidade detectada foi a substituição G→A no *intron* 1 nucleotídeo 110 (*IVS1-110*). Como pode ser observado na figura 38. Importa notar que essa mutação não ocorre em heterozigose, o que sugere fortemente que existe deleção do gene β no outro cromossomo.

2. Caracterização da deficiência gênica associada talassemia $\delta\beta$.

O mapeamento do grupo dos genes β mostrou anormalidades com a sonda δ *IVS2* (Tabela 13). As hibridizações com as sondas RK29 e 3D, apresentaram padrão de bandas normais, embora com menor intensidade que os controles normais em digestões com as enzimas de restrição Ba, Bg, P (Figura 39) e X (Figura 40).

Com a sonda $\delta IVS2$ foram observados fragmentos anormais com digestão pelas enzimas Ba (2,8), Bg (3,0), P (10), X (2,8). Esses dados indicam que o ponto de quebra na posição 5' deve estar localizado no interior do gene δ .

O ponto de quebra na região 3' não foi possível de ser identificado, uma vez que hibridizações com as sondas RK29 e 3D (Figura 41) detectaram a presença de fragmentos de tamanho normais, mas com menor intensidade quando comparados com o DNA do controle normal.

Desse modo, esses dados sugerem ser o paciente portador da associação entre talassemia β (G $\rightarrow$ A, *IVS1-110*) e tal- $\delta\beta^o$ que possui o seu ponto de quebra na posição 5' nas proximidades do gene δ e o ponto de quebra na posição 3' situado após a região 3D. Esse tipo de deficiência gênica mostra alguma semelhança com a talassemia- $\delta\beta$ do tipo espanhola, da qual se diferencia pelo ponto de quebra na posição 5', situado em posição ligeiramente mais próxima da extremidade 5' do gene β (Figura 42).

Tabela 12. Dados hematológicos da família 5

	idade	GV	Hb	Ht	VCM	CHM	HbA2	HbF
	anos	X10¹²/l	g/dl	%	f	pg	%	%
propósito	32	4,36	10,3	32	73,4	25,6	2,2	70
pai	64	6,19	12,8	40	65	23	2,5	7,3
mãe	59	6,98	13,2	41	61	21	4,9	0,6
irmão-1	31	6,7	14,3	44	66	22	2,1	9,8
irmão-2	25	5,32	10,4	31,6	60	22	1,7	72,5

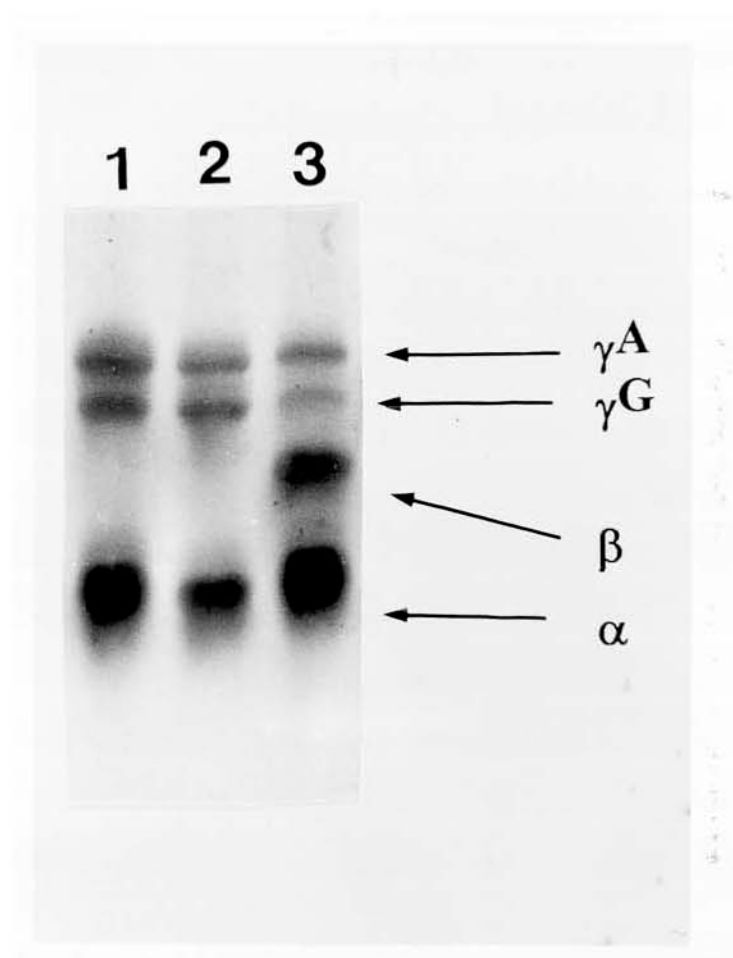


Figura 36. Padrão de bandas observado na eletroforese de Poliacrilamida-Triton-Uréia. Linha 1: recém-nascido. ; Linha 2: caso índice (notar quantidades equivalentes em ambas cadeias γ); Linha 3: adulto normal

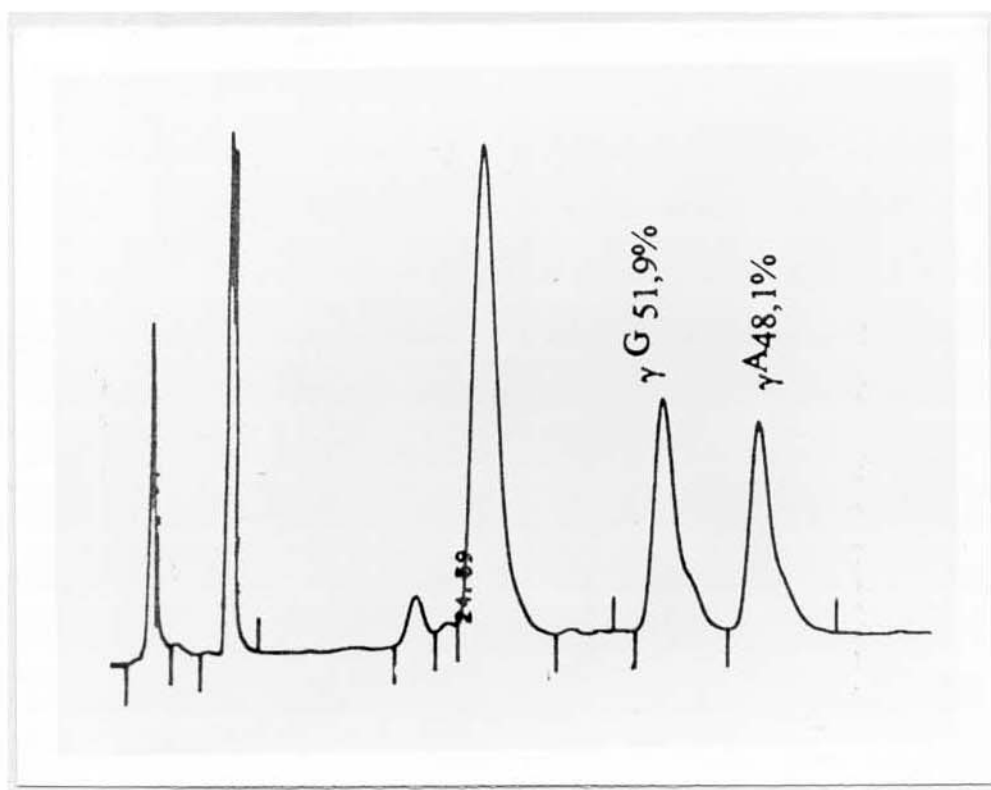


Figura 37. Representação esquemática da cromatografia líquida de alta pressão realizada no paciente portador da talassemia β (IVS1-110, C $\rightarrow$ A) e talassemia- $\delta\beta$.

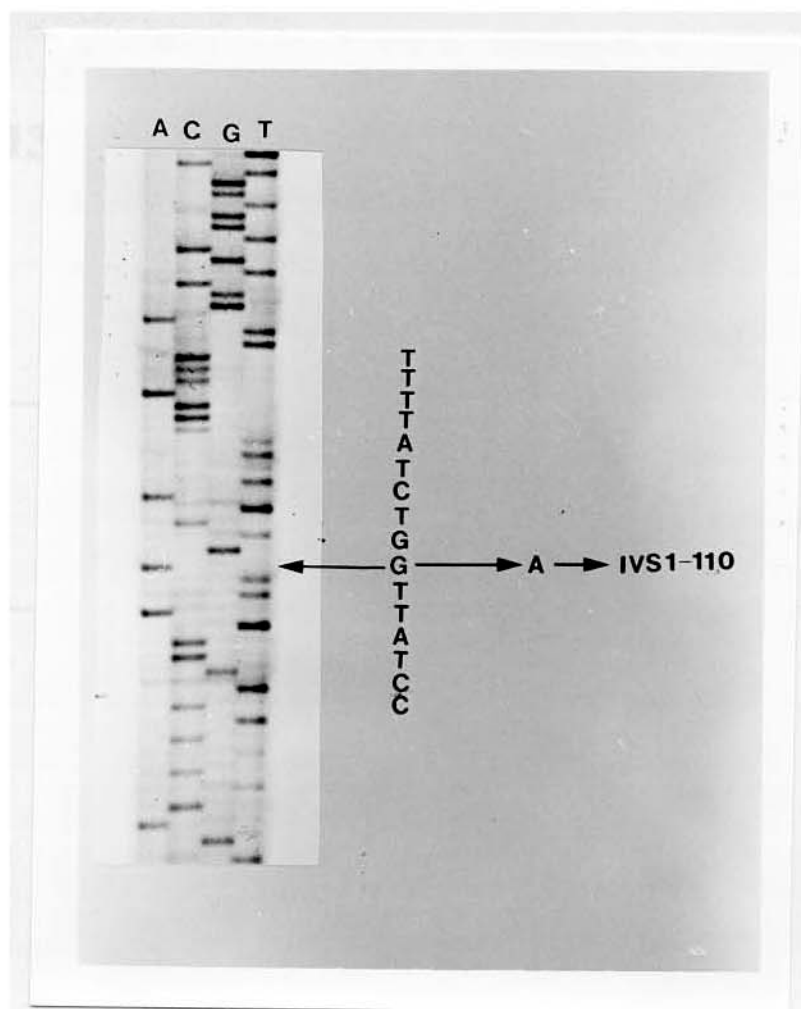


Figura 38. Auto-radiografia do gel de sequenciamento do paciente portador da talassemia- β /talassemia- $\delta\beta$. Amplificação com os *primers* 1 e 2 e sequenciamento com o *primer* 7. A ocorrência de G→A na posição 110 da *IVS1* do gene β está indicado na seta. Notar que ocorre somente presença de A nesta posição sugerindo que existe deleção do gene β no outro cromossomo.

Tabela 13. Fragmentos de DNA observado no mapeamento gênico da amostra de DNA do caso 5.

Probe	Enzima	Tamanho do fragmento (Kb)	
		DNA Controle	DNA do paciente
δIVSII	BamHI	4,4	4,4; 2,8
	BglII	7,9	7,9; 3,0
	PstI	2,3	2,3; 10
	XbaI	11	11; 2,8
RK29	EcoRI	0,7	0,7
	BamHI	16 e 18	16
	PstI	9	9
3D	EcoRI	11	11
	BamHI	1,5	1,5
	PstI	13	13

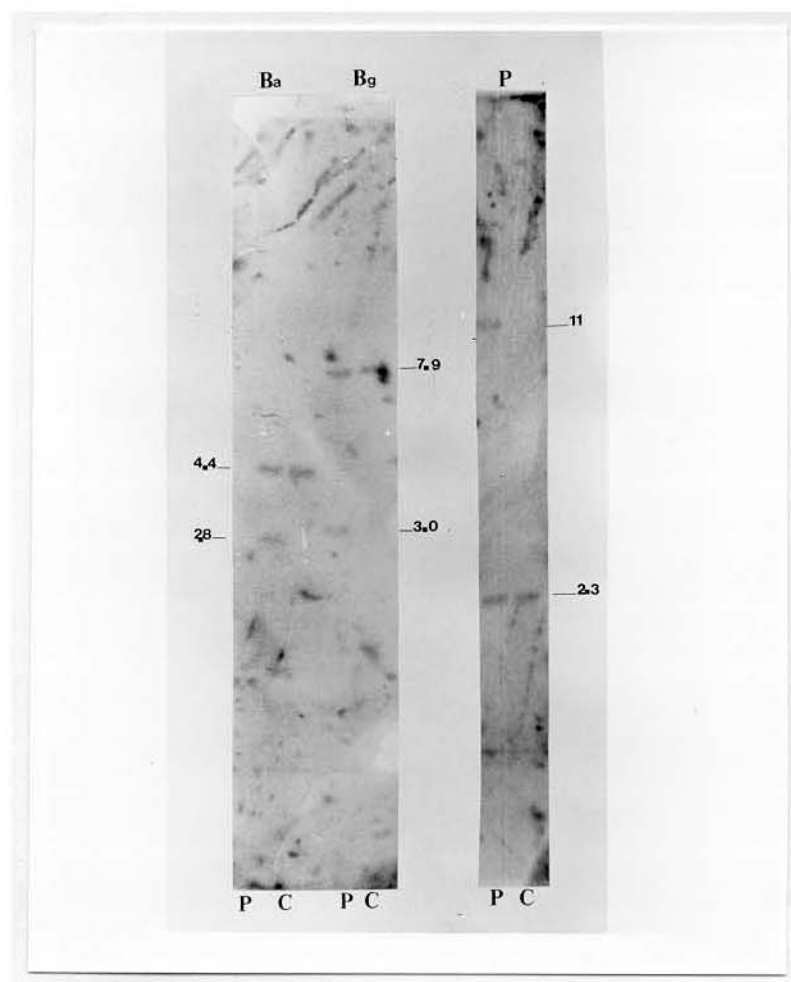


Figura 39. Auto-radiografia do *Southern blot* realizado em DNA normal (C) e do caso índice (P) de número 5, digeridos com as enzimas Ba (2,8), Bg (3,0) e P(11) e hibridizados com a sonda δ . Note-se a presença de bandas de tamanho diferente do encontrado no padrão normal e que estão enumeradas nos parenteses.

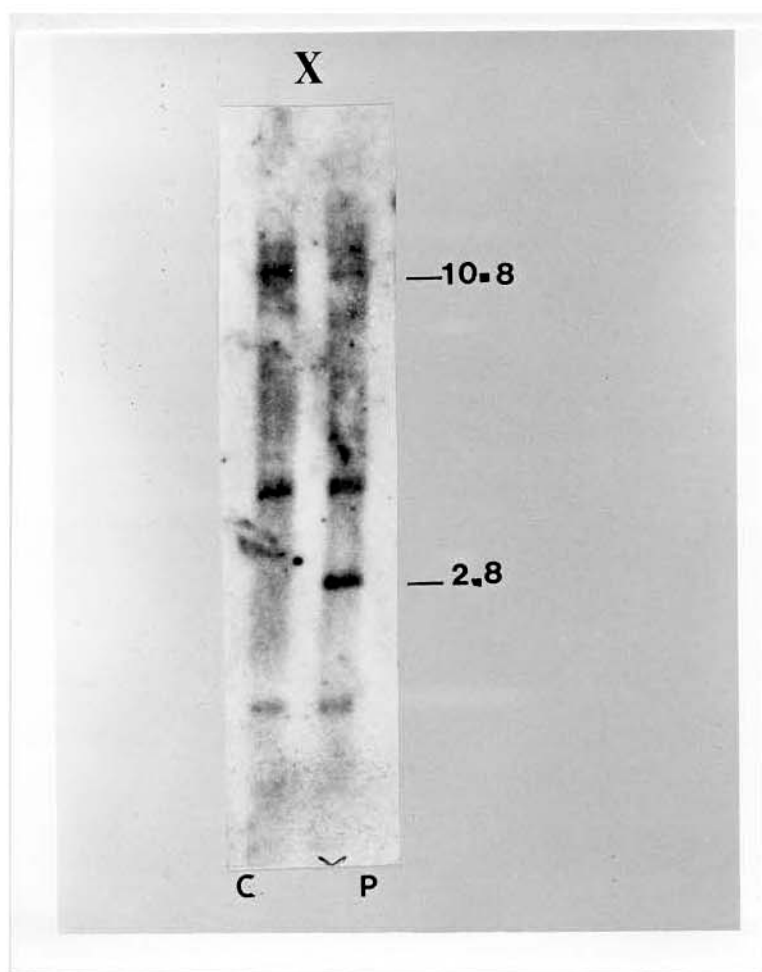


Figura40. Auto-radiografia do *Southern Blot* realizado em DNA normal (C) e do caso índice de número 5, digerido com a enzima de restrição X (2,8) e hibridizado com a sonda $\delta IVS2$. Notar a presença de banda diferente do normal e que está entre parenteses.

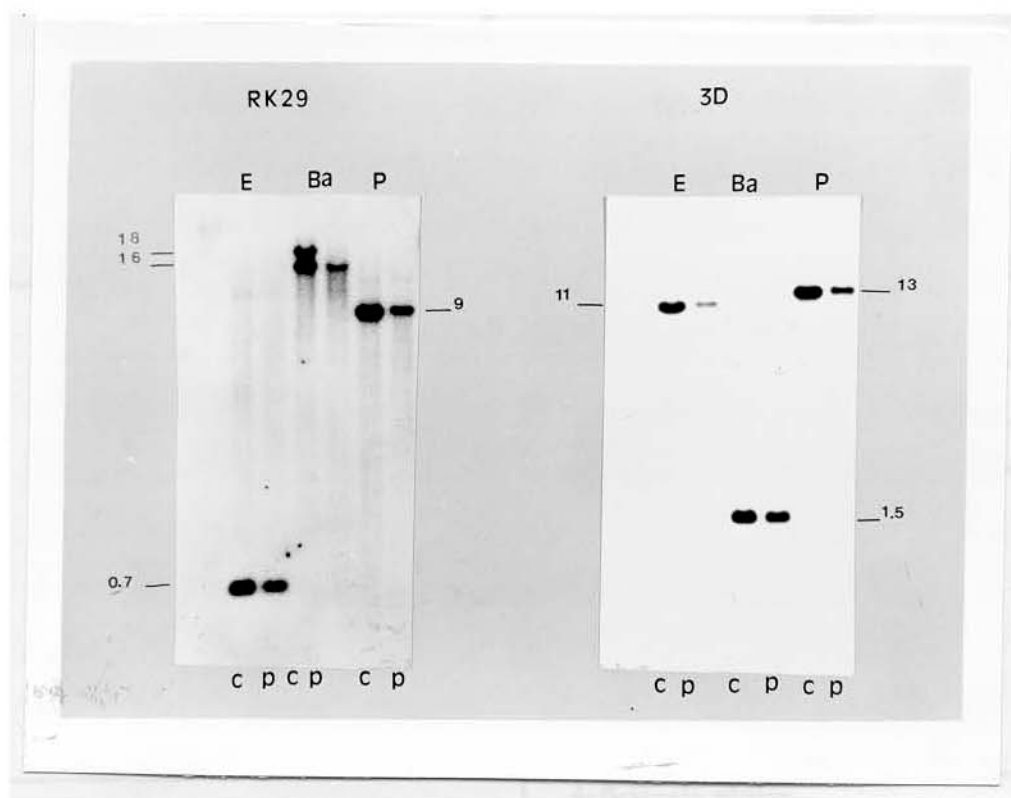


Figura 41. Auto-radiografia do *Southern blot* realizado em DNA normal (C) e do paciente 5 (P), digeridos com as enzimas Ba, E e P e hibridizados com as sondas RK29 e 3D. Notar a presença de bandas com padrão normal no C e P, porém com metade da intensidade no P, demonstrando que estas regiões estão deletadas.

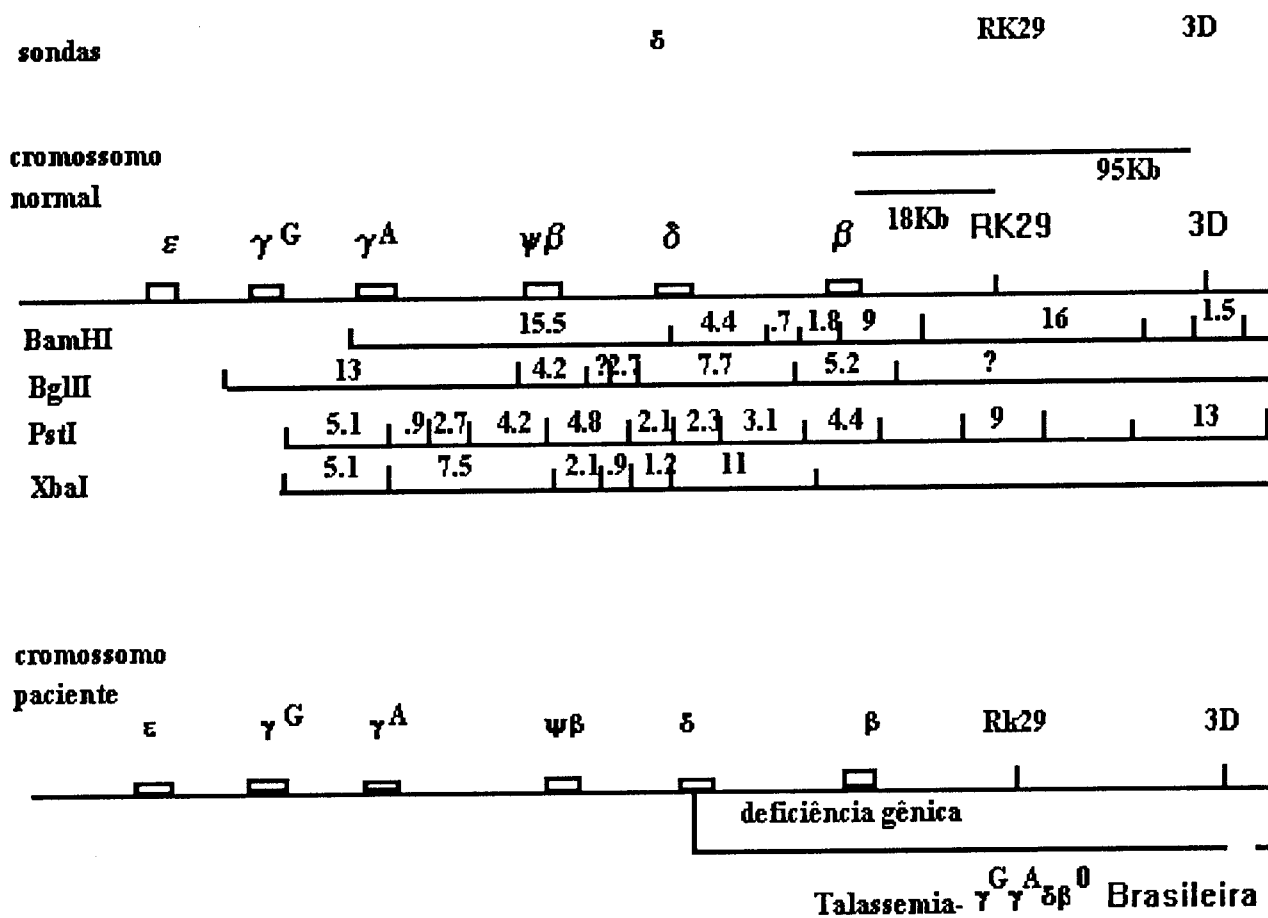


Figura 42. Representação esquemática das bandas detectadas no mapeamento do grupo de genes β para as enzimas de restrição BamHI, EcoRI, PstI, XbaI e HpaI, nas regiões δ , RK29 e 3D.

DISCUSSÃO

A compreensão dos mecanismos envolvidos na ontogênese das cadeias de globina humana apresenta importância ímpar não só pelos avanços que pode proporcionar no entendimento dos fatores determinantes da expressão gênica como pelo potencial terapêutico nas hemoglobinopatias, representado pela possível manipulação da expressão dos genes da globina gama (Bunn & Forget, 1986). Os primeiros dados a respeito das possíveis sequências gênicas responsáveis por esses mecanismos advieram da identificação e caracterização molecular de indivíduos portadores da PHHF e tal- $\delta\beta$. Estas duas condições representam um grupo raro de hemoglobinopatias quando comparado ao das alterações talassêmicas e as variantes estruturais da hemoglobina (Weatherall & Clegg, 1981). Desta forma, os relatos de indivíduos afetados por essas condições são relativamente pouco frequentes nas diversas populações do mundo.

A origem étnica da população brasileira apresenta aspectos únicos que a distiguem dos demais países da América. Seus diversos componentes estão distribuídos de forma geograficamente irregular no país. Assim, no nordeste predominam os descendentes de africanos, ao passo que no sul apresentam maior frequência aqueles oriundos de imigração européia. Além dos colonizadores portugueses, o Brasil recebeu elevado número de escravos africanos e imigrantes da Itália, Espanha, Japão, Alemanha e Oriente Médio. Todos esses grupos raciais estão submetidos a um progressivo processo de miscigenação. A intensidade desse evento é de difícil avaliação no país como um todo, mas a análise conduzida por Azevedo *et al* (1981) na Ilha de Itaparica no Estado da Bahia mostrou que a proporção de mulatos praticamente duplicou, ao passo que a de brancos foi reduzida a um terço em cerca de 90 anos (1889-1980). Estes dados reforçam a ideia de que a frequência de anormalidades hereditárias das hemoglobinas devem variar nas diferentes regiões do país e refletem as origens étnicas e o grau de miscigenação das populações envolvidas.

A caracterização molecular do caso de γ^G PHHF (C $\rightarrow$ G , -202) descrita nesse trabalho representa o primeiro relato dessa anormalidade na América do Sul. Foram descritos na literatura cerca de 14 indivíduos portadores desta mutação, e o primeiro caso foi identificado por Jones *et al*, 1982 em uma família americana de origem africana, do mesmo modo que os demais casos descritos (Collins *et al*, 1984a). Esta mutação resulta em aumento de 30 a 40 vezes na síntese da cadeia γ^G . A explicação para este fato tem sido objeto de inúmeras investigações com resultados que permitiram elucidar alguns aspectos dos mecanismos envolvidos no controle da expressão gênica. Esta substituição de nucleotídeo provoca aumento da interação com o fator protéico (*Trans-acting factors*) não-eritróide Sp1 que atua como estimulador da transcrição gênica e, além disso, provavelmente diminui a interação na mesma posição de um segundo fator ainda não bem definido, que inibiria a transcrição gênica. Adicionalmente, de modo indireto parece ocorrer uma alteração nos sítios de interação com os fatores Oct-1 e GATA-1 que estimulariam a transcrição gênica. (Collins *et al*, 1984b; Sykes & Kaufman, 1989). Essa mutação também produz sequências que possuem grande homologia com elementos localizados na região promotora dos genes do *Herpes Simplex Tymidine Kinase* (HSV TK) (McKnight, 1982; McKnight & Kingsbury, 1982) e do *Simean Virus 40* (SV40) (Everett *et al*, 1983), o que possivelmente deve contribuir para esse grande aumento na produção do gene γ^G . Surpreendentemente, a substituição C $\rightarrow$ T na mesma posição (-202), da região promotora do gene γ^A está associada a um incremento menor, de somente seis vezes, na expressão desse gene, apesar de também nesse caso, ocorrer aumento na interação da região promotora com o fator Sp1. Essa diferença é devida provavelmente ao tipo de substituição que acontece nesse caso (C $\rightarrow$ T), o que resulta provavelmente em sequências com menor poder estimulador da transcrição gênica (Gilman *et al*, 1988; Sykes & Kaufman, 1989).

Além disso, a presença da mutação abole o sítio de clivagem para a enzima de restrição ApaI, o que fornece um método rápido e seguro da identificação dessa mutação nos casos que a análise protéica sugere a γ^G PHHF do tipo -202 (Collins *et al*, 1984a ; Novelletto *et al*, 1987).

O segundo caso de PHHF-mp encontrado em nossa amostra foi caracterizado como secundário à substituição C→G na posição -195 da região promotora do gene γ^A . Esta mutação havia sido anteriormente descrita pela primeira vez em uma família brasileira, que apresentava níveis de HbF ao redor de 7,0% e cadeias γ^A com percentagens variando entre 86 à 90 (Costa *et al*, 1990). O caso aqui descrito representa o segundo relato desta mutação e as quantificações de HbF na família estudada neste trabalho são semelhantes às aquelas descritas anteriormente. Importa ressaltar que as duas famílias aparentemente não são relacionadas. Outra observação interessante relacionada ao caso aqui estudado foram os níveis relativamente elevados de cadeia γ^G (30%). A explicação para esse achado não é clara e permanece por ser esclarecida. O estudo pormenorizado da região promotora do gene γ^G não revelou nenhuma anormalidade, afastando assim a possibilidade de ocorrência do polimorfismo -158 (C→T) (Gilman & Huisman, 1985), que em algumas eventualidades está associado ao aumento de síntese de γ^G . O mecanismo conducente ao aumento de HbF nesta mutação (tipo brasileiro de γ^A -PHHF) ainda não foi investigado do ponto de vista de interação de fatores protéicos com DNA. Esta alteração está localizada em área próxima ao sítio de interação com o fator eritróide GATA-1 e é caracterizada pela presença de níveis relativamente baixos da HbF. Nesta mesma região já foram descritas as mutações T→C na posição -198 (Tate *et al*, 1986) e a mutação C→T na posição -196 (Gelinas *et al*, 1986). Apesar de estarem localizadas próximas à mutação -195, estas formas possuem um comportamento ligeiramente diferente. Assim, a mutação -198 está associada a um aumento moderado da HbF (3,5 a 10%) e resulta no aumento da interação com o fator Sp1 (Fischer & Nowock, 1990 ; Ronchi *et al*, 1989). A

mutação -196 está associada a valores relativamente altos da HbF (12 a 16%) e diminuição *in vitro* na afinidade para o fator Sp1 (Ronchi *et al*, 1989). É razoável supor, portanto, que a mutação -195 (C→G) também interfere com esses fatores *trans* e conduz ao aumento da HbF. Adicionalmente, este caso exemplifica o ajuste fino que existe no controle da transcrição gênica, onde mudanças em posições extremamente próximas leva a taxas de produção diferente dos genes. Outro fato que merece atenção é a observação que os dois únicos casos dessa condição foi realizada na população brasileira. A interpretação para esse dado é evidentemente ainda não determinada, mas é possível especular que não se trata de simples coincidência, e este tipo de mutação poderia ser característico da população negróide no Brasil, que sabidamente teve origem diferente daquela dos EEUU e Jamaica (Curtin, 1964), onde a maioria dos estudos abordando indivíduos com PHHF foram levados a efeito.

Além das mutações descritas anteriormente, diversas outras formas de PHHF-mp foram caracterizadas. A mutação T →C na posição -175 em ambos os genes γ^G e γ^A interfere com as interações do Oct-1 e o GATA-1 levando ao aumento moderado de HbF (Gumucio *et al*, 1988; Mantovani *et al*, 1988; Martin *et al*, 1989; Ottolenghi *et al*, 1988; Stoming *et al*, 1989; Surrey *et al*, 1988). Outra mutação já bem estudada é a substituição C→A na posição -117 da região promotora do gene γ^A (PHHF-mp do tipo Gega) e que está localizada dois nucleotídeos depois do segundo elemento CCAAT-box (Collins *et al*, 1985; Gelinas *et al*, 1985). Esta mutação está associada a um aumento de quatro vezes na interação entre o fator CP1 e o CCAAT-box e de duas vezes na interação com os fatores eritróides GATA-1 e NFE-3, resultando em grande aumento da HbF (10 a 20%) (Gumucio *et al*, 1988; Mantovani *et al*, 1988; Stoeckert *et al*, 1987; Superti-Furga, 1988). Outra alteração associada ao aumento de HbF é a deficiência de 13pb localizada entre as posições -114 a -102 da região promotora do gene γ^A que remove a segunda estrutura CCAAT-box, eliminando desta forma a interação com os fatores CP1, CDP e NFE3, sem alterar a interação com o fator

GATA-1 (Gilman *et al*, 1988; Mantovani *et al*, 1988). Finalmente, uma alteração descrita em japoneses, C→T na posição -114 da região promotora do gene γ^G está relacionada com a alteração do sítio de interação com a proteína CP1, e elevação moderada de HbF (11 a 14%)(Fucharoen *et al*, 1990).

No presente estudo, duas formas diferentes de PHHF por deficiência gênica foram encontradas. A primeira delas foi caracterizada como heterozigose para PHHF por deficiência gênica do tipo 1 e a segunda como heterozigose para PHHF por deficiência gênica do tipo 2 associada a talassemia β (G→C, IVSI-5). As primeiras descrições destes dois tipos de PHHF foram feitas respectivamente em negros americanos (Tuan *et al*, 1979) e em um indivíduo negro proveniente de Ghana (Tuan *et al*, 1980). Na literatura existem raras descrições desses tipos de PHHF. Os achados deste trabalho constituem os primeiros exemplos dessas condições em populações da América do Sul.

As deficiências gênicas que originam as PHHF por deficiência gênica do tipo 1 e 2 são de tamanho equivalentes e caracterizadas pela perda de aproximadamente 105Kb de DNA no grupo de genes da globina β . O ponto de quebra na posição 5' está localizado em um elemento da família AluI e o seu ponto de quebra na posição 3' localizado cerca de 95Kb após a posição 3' do gene β (Tuan *et al*, 1983). Ambas se diferenciam pelos pontos de quebra nas regiões 3' e 5' , que são cerca de 6Kb menores na do tipo 2 em relação a do tipo 1.

O reconhecimento da PHHF do tipo 1 (Martinez *et al*, 1990) e 2 pela amplificação da região do ponto de quebra, como realizado nesse trabalho, representa avanço importante na identificação dessa anormalidade, pois evita os métodos trabalhosos e demorados como o *Southern Blot*.

Os dois indivíduos aqui estudados eram de descendência africana, de acordo com os relatos prévios da literatura. O caso 4, em que foi detectada a associação entre PHHF do tipo 2 e talassemia β apresenta-se como exemplo clássico de benefício clínico que a

produção elevada de cadeias γ e consequente incremento de HbF pode resultar nas hemoglobinopatias. Nesse exemplo, os níveis de HF foram sempre elevados, com evolução clínica de talassemia intermediária, embora a acentuada alteração óssea tenha provocado a necessidade de terapêutica transfusional, com o intuito de bloquear a eritropoese endógena.

A alteração molecular detectada nesse caso de talassemia β foi a substituição G $\rightarrow$ C na IVS1-5 que cria um sítio de clivagem alternativo dentro das sequências de junção *Exon-Intron* causando um defeito grave na produção das cadeias β , que são produzidas em pequenas quantidades (Talassemia do tipo β^+) (Weatherall, 1991). Este tipo de mutação, descrita em populações de origem asiática, chinesa e melaneses representa o primeiro caso na população brasileira. Estudo anterior de Martins (1993) demonstrou que nessa população mais de 90% dos heterozigotos para talassemia β apresentavam três tipos de mutações originárias de populações do Mediterrâneo: mutação ambar no *codon* 39 (A $\rightarrow$ T, 64,28%), IVS1-110 (20,02%) e IVS1-6 (7,14 %).

Algumas hipóteses foram formuladas na tentativa de explicar o mecanismo pelo qual estas deficiências gênicas resultam em expressão elevada dos genes γ nas PHHF por deficiência gênica e porque deficiências gênicas semelhantes originam tal- $\delta\beta$, onde o incremento da síntese de cadeias γ não é tão acentuada e existe microcitose e hipocromia com desequilíbrio na síntese de cadeias α e não- α (Bernards & Flavell, 1980; Huisman *et al*, 1974; Ottolenghi *et al*, 1982). Estas hipóteses focalizam primordialmente o possível papel das sequências localizadas nos pontos de quebra das posições 5'e 3'das diversas deleções descritas.

Aproximadamente 20 anos atrás, Huisman *et al* (1974) foram os pioneiros na tentativa de explicar esse fenômeno. Essa primeira hipótese seria que sequências localizadas entre os genes γ^A e δ poderiam estar envolvidas na regulação da transição da síntese de HbF para HbA, através da presença de um elemento silenciador que exerceria o controle da produção dos genes γ . Dados posteriores mostraram que esta

região possuía sequências da família AluI, consideradas como sujeitas à ocorrência de eventos de recombinação gênica e possivelmente atuando como elementos reguladores em potencial.

Esta hipótese explicaria de modo convincente as formas de PHHF-dg do tipo 1, 2 e também as PHHF-dg decorrentes de deleções menores, como as do tipo 3 e 4. Nestas síndromes as sequências AluI localizadas na posição 5' estão completamente ausentes. Em apoio à noção de que elementos reguladores entre os genes γ^A e δ teriam papel importante nessas síndromes, os primeiros casos de Tal- $\delta\beta$ caracterizados do ponto de vista molecular corroboraram a hipótese de Huisman *et al* (1974), pois em maior ou menor grau, em todas elas essa região era preservada. No entanto, o estudo de vários outros casos de Tal- $\delta\beta$ em que essa região estava completamente deletada, como, por exemplo, o descrito em um indivíduo originário da Turquia (Tal- $\gamma^G(\gamma^A\delta\beta)^\circ$), fez com que o apoio a essa primeira hipótese diminuísse consideravelmente (Fritsch *et al*, 1979; Henthorn *et al*, 1990; Orkin *et al*, 1979; Tuan *et al*, 1979).

Mais recentemente, sequências de DNA com localização adjacentes aos pontos de quebra da posição 3' nas PHHF 1 e PHHF 2 foram descritas como possuidoras de elementos potencialmente importantes na geração do fenótipo de PHHF. Nesse caso, foi interpretado que estas sequências que seriam potencialmente ativadoras da transcrição gênica, seriam deslocadas para a proximidade dos genes γ^G e γ^A como resultado direto da recombinação gênica ocorrida, e assim poderia resultar em aumento de síntese dessas cadeias de globina (hipótese de Forget). Numerosos estudos envolvendo essas regiões mostraram que estas sequências poderiam possuir atividade estimuladora (*enhancer*) da transcrição gênica *in vitro*, seriam especificamente hipometiladas e teriam sítios hipersensitivos à ADNase em culturas de células eritróides (Chapman *et al*, 1984; Feingold *et al*, 1985; Kollias *et al*, 1987; Ponez *et al*, 1987; Razia *et al*, 1984a e b; Trudel & Constantin, 1987). Em 1989, Feingold & Forget caracterizaram um fragmento localizado na posição 3' do ponto de quebra da

PHHF-dg do tipo 1, que foi genericamente denominada 3D. Experimentos de expressão gênica *in vitro* demonstraram que esta sequência de DNA possui atividade estimuladora da transcrição gênica em células leucêmicas eritróides de camundongos e em células K562 da eritroleucemia humana, tendo portanto uma atividade tipo *enhancer* (Jennings *et al* , 1985; Mager *et al*, 1985; Nicholls *et al*, 1987; Spritz & Orkin, 1982). A análise de nucleotídeos realizada neste fragmento revelou uma sequência potencialmente codificadora para uma proteína (*open reading frame*). Ainda não está claro se esta região corresponde a um *exon* de um grande gene ou a um gene sem *introns* . Certos aspectos sugerem que poderia representar um *exon* central de um grande gene. Esta região contém na sua posição 5', duas sequências semelhantes as *TATA-box* encontradas nas regiões promotoras. Além disso foi observada uma sequência homologa àquelas existentes nas regiões conservadas nos locais de clivagem dos *introns* (*splice site*) (Keller & Noon, 1984; Reed & Maniatis, 1985). Ainda, esta região apresenta homologia com vários *enhancers* previamente descritos. Assim possui 4 regiões idênticas ao *enhancer* do *SV40*; uma sequência com identidade parcial ao *enhancer* localizado na posição 5' do gene γ^A humano (Bodine & Ley, 1987) e na posição 3' do gene β de aves (Choi & Engel, 1986; Hesse *et al* , 1986).

Esse conjunto de resultados originam a proposição de que esta região pode contribuir para a manutenção da expressão dos genes γ , cujo efeito poderia ser determinado através de um ou mais *enhancers* que estimulariam sua transcrição e consequentemente o estabelecimento do fenótipo de PHHF. Corroborando esta hipótese foi descrito um tipo de Tal- $\delta\beta$ denominada tipo Espanhola, cujo ponto de quebra na posição 5' localiza-se cerca de 1Kb antes do da PHHF-dg do tipo 1, mas que se estende cerca de 8,5 a 9,0 Kb além do ponto de quebra da posição 3'. Esta deficiência remove a região 3D e sequências de DNA adjacentes, resultando no aparecimento de fenótipo de Tal- $\delta\beta$ (Camaschella *et al*, 1987; Ottolenghi & Giglioni, 1982). O paciente com Tal- $\delta\beta$ estudado neste trabalho é descendente de italianos e a

deficiência gênica tem início na *IVS2* do gene δ e estende além da região 3D. Estes dados sugerem que esse tipo de deleção gênica seria diferente dos anteriormente descritos, constituindo uma nova forma de tal- $\delta\beta$. Assim, em concordância com a tradição de denominar os casos novos desses tipos de talassemias de acordo com o país ou a região geográfica de origem dos pacientes, poderíamos denominá-la talassemia $\delta\beta$ do tipo Brasileiro. A anormalidade molecular desta talassemia- $\delta\beta$ descrita neste trabalho apresenta dados em apoio a Hipótese de Forget, pois a remoção da região 3D resulta em talassemia- $\delta\beta$ e não em PHHF.

Merece menção a identificação de dois tipos de Tal-($\gamma^A\delta\beta$)^o em que a região 3D é conservada, porém sem o desenvolvimento de PHHF. A primeira delas, descrita em chineses (Mager *et al*, 1985) e a segunda em belgas (Fodde *et al*, 1990). Estas talassemias possuem o seu ponto de quebra na posição 3' cerca de 18kb antes do da PHHF-dg do tipo 1 e desencadeiam um fenótipo de talassemia, apesar de promoverem a transferência de toda a região 3D para a proximidade dos genes γ . Esta discrepância aparentemente se deve ao fato de que nestas formas de talassemia ocorre a deficiência parcial do gene γ^A e que para o aparecimento da PHHF seria necessário a presença dos dois genes γ intactos (Feingold & Forget, 1989). Além disso, o fragmento 3D nesses casos situava-se em posição mais distante em relação ao gene γ do que nos casos de PHHF tipos 1 e 2, o que poderia interferir na possível ação estimulatória desse fragmento.

Também nesse caso, a associação de uma condição que incrementa a produção de HbF (tal- $\delta\beta$), mesmo que em menor grau que a PHHF, com um alelo talassêmico β , tem como resultado final a evolução clínica benigna apresentada pelo paciente. Deve-se ressaltar que a mutação *IVS1-110* (C→A) é caracterizada por apresentar manifestações clínicas graves nas homozigotos para esta condição. Esta mutação é a segunda mais frequente na população brasileira (Martins *et al*, 1993).

A análise global dos resultados desse trabalho permite concluir que aparentemente a população brasileira apresenta grande heterogeneidade nas alterações moleculares que originam PHHF e tal- $\delta\beta$. Foram caracterizados pela primeira vez nessa população as mutações PHHF por mutação de ponto -202 (C→G), a PHHF por deficiência do tipo 1, a PHHF por deficiência gênica do tipo 2, a segunda descrição da PHHF por mutação de ponto -195 (C→G) e aparentemente uma forma detal- $\delta\beta$ ainda não descrito.

Além disso, os dados aqui apresentados corroboram, em parte, a proposição de Feingold & Forget (1989) de que sequências de nucleotídeos compreendida na região 3D seriam importantes na origem das PHHF.

CONCLUSÕES

- As diferentes formas de PHHF e tal- $\delta\beta$ aqui descritas enfatizam a peculiar heterogeneidade genética da população brasileira e representam os primeiros casos de quatro dessas condições caracterizadas na população brasileira.
- A γ A-PHHF com mutação na região -195 (C→G) representa o segundo caso descrito na literatura mundial e poderia ser característica da população brasileira.
- Foi desenvolvido um procedimento rápido pela PCR para identificação da PHHF do tipo 2, que evita as técnicas demoradas e complexas do *Southern blot*.
- A tal- $\delta\beta$ por deficiência gênica provavelmente representa uma nova variante da doença. Além disso, o tipo de deleção gênica forma apoio a hipótese de que sequências na região 3D teriam importância fundamental na gênese de casos de PHHF.

RESUMO

Nos últimos dez anos, informações relacionadas à regulação da expressão do grupo de genes da globina β foram adquiridas pela análise das alterações moleculares detectadas em distúrbios como as PHHF e as Tal- $\delta\beta$. Estas condições são caracterizadas por apresentação heterogêneas do ponto de vista hematológico e molecular e mostram alteração no programa normal da transição de síntese da HbF para a HbA, constituindo modelos de acesso fácil para a compreensão da fisiologia deste mecanismo.

No presente trabalho foram estudadas cinco famílias brasileiras, que apresentavam formas diferentes de PHHF e/ou Tal- $\delta\beta$. Os métodos envolvidos incluíram o mapeamento gênico por *Southern Blot*, sequenciamento de fragmentos de DNA amplificados pelo PCR e confirmação das mutações por hibridização alelo específica.

Assim, foram caracterizados dois heterozigotos para PHHF por mutação de ponto, a substituição C→G na posição -195 e a C→G na região -202, encontradas respectivamente nas regiões promotoras dos genes γA e γG ; duas formas de PHHF por deficiência gênica, a primeira um heterozigoto para PHHF do tipo 1 e a segunda um portador em heterozigose dupla para talassemia- β (C→G, IVSI-5) e PHHF do tipo 2. O último caso estudado, representado por portador em heterozigose para Talassemia- β (G→A, IVSI-110) e uma forma de Tal- $\delta\beta$, por deficiência gênica provavelmente ainda não descrita na literatura. Essa deficiência tem um ponto de quebra na região 5' no interior do gene δ e na região 3' em algum ponto da região 3D. Em seu conjunto estes dados confirmaram a grande heterogeneidade das alterações hemoglobínicas encontradas no Brasil e constituem os primeiros casos de γG -PHHF -202 (C→G), PHHF do tipo 1, PHHF do tipo 2, descritos nessa população. A descrição da γA -PHHF -195 (C→G) representa o segundo caso na literatura mundial e prova ser característica

da população negróide brasileira. Finalmente a caracterização molecular do paciente com tal- $\delta\beta$ evidenciou um tipo ainda não descrito dessa alteração, que provavelmente deve ser denominado tal- $\delta\beta$ do tipo brasileira.

SUMMARY

The $\delta\beta$ -thalassemias and the hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) represent two heterogeneous groups of conditions, characterized by continuous expression of fetal hemoglobin in adult life, as a result of either variable length deletion or point mutation in the β -globin cluster. Current models attempting to explain the continuous expression of the γ -globin genes in adults carrying these mutations, include the deletion of negative regulatory sequences, the juxtaposition of enhancer-like sequences in the vicinity of the γ -globin gene, modifications of the chromatin structure within the β -globin cluster as a result of the deletion or modifications of interaction between cis and trans-acting factors in the promoter region of the γ -globin genes as a result of point mutations.

In this work we carried out the molecular characterization of five Brazilian individuals with HPFH or $\delta\beta$ -tal. Two point mutations were identified as cases of HPFH: the -202 (C→G) and the -195 (C→G) at the G_γ and A_γ globin gene promoter respectively. The -202 (C→G) represents the first description in the Brazilian population, and the -195 (C→G) the second case reported in the literature. Additionally, two other individuals were identified as a deletion type of HPFH: one with HPFH type 1 and the other HPFH type 2. These cases represent the first description in South America. In addition, we develop a rapid procedure by using PCR for identification of HPFH type 2.

One patient with $\delta\beta$ -tal was studied and presented a possible novel type of deletion, which we tentatively named the Brazilian type of $\delta\beta$ -thalassemia. Moreover, this case offers support to the possible role of the 3D region in the origin of the HPFH phenotype (Forget's hypothesis).

Taken together these findings emphasize the ethnic heterogeneity of the Brazilian population and contributed for the understanding of some mechanisms involving in the overexpression of the γ globin genes.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- Adams J.W.; Kaufman R.E.; Kretschmer P.J.; Harrison M. and Nienhuis A.W. A family of long reiterated DNA sequences ,one copy of which is next to the human β globin gene. *Nucleic. Acids. Res.* 8:6113-6128, 1980.
- Altay C.; Huisman T.H.J.; Schroeder W.A. Another form of HPFH (The Atlanta type)?. *Hemoglobin* 1:125,1977.
- Alter B.P.; Goll S.C.; Frenov G.D.; Gravely E-; Huisman T.H.J. Globin chain electrophoresis: a new approach to the determination of the $\alpha\gamma/\alpha\gamma$ ratio of globin synthesis., *Br. J. Haematol.* 44:525-534, 1980.
- Anagnou N.P.; Papayannopoulou T.; Stamatoyannopoulos G.; Nienhuis A.W.: *In vitro* modulation of γ -gene expression by fetal switching factor in two types of $(A\gamma\delta\beta)^0$ -Thal. *Blood*, 64 (Suppl I):61a, 1984.
- Anagou N.P.; Papayannopoulou T.; Stamatoyannopoulos G.; Nienhuis A.W. Struturally diverse molecular deletions in the β -globin gene cluster exhibit an identical phenotype an interaction with the β^S -gene.*Blood* 65:1245-1251,1985.
- Anagou N.P.; Papayannopoulou T.; Nienhuis A.W.; Stamatoyannopoulos G. Molecular characterization of a novel form of $(A\gamma\delta\beta)^0$ -Thalassemia deletion with a 3' breakpoint close to those of HPFH-3 and HPFH-4: Insights into a common regulatory mechanism. *Nucl. Acids. Res.*, 16:6057-6066,1988.
- Atweh G.F.; Zhu D-E., Forget B.G.: A novel basis for $\delta\beta$ -Thal in a Chinese family.*Blood* 68:1108-1111,1986.
- Atweh G.F.; Brickner H.E. The β -globin gene on the Chinese $\delta\beta$ -Thal chromosome carries a promoter mutation. *Blood*, 70:1470-1474, 1987.
- Azevedo E.S.; Silva K.M.C.; Silva M.C.B.O.; Lima A.M.U.M.; Fortuna C.M.M.; Santos M.G. Genetic and anthropological studies in the Island of Itaparica Bahia, Brazil. *Hum. Her.* 31:353-357,1981.
- Bank,A. The thalassemia syndromes. *Blood* 51: 369-384,1978.

- Baralle F.E.; Shouders C.C.; Proudfoot N.J.: The primary structure of the human ϵ -globin gene: *Cell*:21,621-626, 1980.
- Behringer R.R.; Hommer R.E.; Brinster R.L.; Palmiter R.D.; Townes T.M. Two 3' sequences direct adult erythroid-specific expression of human β globin genes in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ,84:7056-7060, 1987.
- Benoist C.; O'Hare K.; Beathnach R.; Chanbon P. The ovalbumin gene-sequence of putative control regions. *Nucleic. Acids. Res.* 8:127-142,1980.
- Bernards R.; Kooter J.M.; Flavell R.A. Physical mapping of the globin gene deletion in $(\delta\beta)^0$ -Thalassemia. *Gene* 6:265-280,1979.
- Bernards R.; Flavell R. Physical mapping of the globin gene deletion in HPFH. *Nucleic. Acids. Res.* 8:1521-1534,1980.
- Betke K.; Marti H.R.; Schlicht I. Estimation of small percentage of foetal haemoglobin. *Nature* 184: 1877-1878,1959.
- Bodine D.M.; Ley T.J. An enhancer element lies 3' to the human $\Lambda\gamma$ globin gene. *EMBO J* 6:2997-2301,1987.
- Bollekens J.A. & Forget B.G. $\delta\beta$ -Thalassemia and Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin. *Hematology / Oncology Clinics of North America.* (5)3:399-422,1991.
- Boyer S.H.; Belding T.K.; Margolet L.; Noyes A.N.: Fetal Hb restriction to a few erythrocytes (F cells) in normal human adults. *Science* 188:361-363,1975.
- Boyer S.H.; Margolet L.; Boyer M.L.; Huisman TH.J.; Schroeder W.A.; Wood W.G.; Weatherall D.J.; Clegg J.B.; Cartner R.: Inheritance of F cell frequency in herocellular HPFH: An example of allelic exclusion. *Am. J. Hum. Genet.* 29:256-271,1977.
- Bunn H.F.& Forget B.G. *Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects*. Philadelphia, PA, Saunders, 1986.
- Camaschella C.; Serra A.; Betero M.T.; Trento M.; Dall'Acqua M.; Gottardi E.; Izzo P.; Brancati C.; Mazza U.; Saglio G. Molecular characterization and hematological phenotype of Sicilian $\delta\beta$ -Thalassemia. *Haematologica* 71:287-293,1986.

- Camaschella C.; Serra A.; Saglio G.; Baiget M.; Malgaretti N.; Mantovani R.; Ottolenghi S. The 3'end of the deletions of Spanish ($\delta\beta$)⁰-Thalassemia and HPFH-1 and 2 lie within 17 kilobases. *Blood* 70:593-596,1987.
- Camaschella C.; Oggiano L.; Sampietro M.; Gottardi E.; Alfarano A.; Pistidda P.; Dore F.; Taramelli R.; Ottolenghi S.; Longinotti M. The homozygous state of $\delta\gamma$ to $\delta\gamma$ HPFH. *Blood* 73:1999-2002,1989.
- Camaschella C.; Serra A.; Gttardi E.; Alfarano A.; Revello D.; Mazza V. : Saglio G.: An HPFH deletion has a breakpoint within the 3' β -globin gene enhancer. *Blood*, 75:1000-1005,1990.
- Cao A.; Melis M.A.; Galanello R.; Angius A; Furbetta M.; Giordondo; Bernini L.F. $\delta\beta$ (F)-Thalassemia in Sardinia. *J. Med.Genet.*,19:184-192,1982.
- Charnay P.; Mellon P.; Maniattis T. Linker scanning mutagenesis of the 5'flanking region of the mouse beta-major globin gene. Sequence requirements for transcription in erythroide cells. *Mol.Cell.Biol.*5:1498-1511,1985.
- Chapman V.; Forrester L.; Sanford J.; Hastie N.; Rossant J. Cell lineage-specific undermethylation of mouse repetitive DNA. *Nature* 307: 284-290, 1984.
- Charache S.; Clegg J.B.; Weatherall D.J. The negro variety of HPFH is a mild form of thalassemia. *Br. J. Haemat.* 34:527-534,1976.
- Choi O-R.; Engel J.D. A 3'enhancer is required for temporal and tissue-specific transcription activation of chicken adult β -globin gene. *Nature* 323:731-734,1986.
- Coggins L.W.; Gridlay G.J.; Vadd J.K.; Slater A.A.; Montaque P.; Stinson M.A.; Paul J. Repetitive DNA sequences near three human beta-type globin genes. *Nucleic. Acids. Res.* 8:3319-3333,1980.
- Coggins L.W.; Lanyon W.G.; Slater A.A.; Grindlay G.J.; Paul J. Characterization of Alu I family repetitive sequences which flank human β -type globin genes. *Biosci. Rep.*1: 309,1981.

- Collins F.S.; Boehm C.; Waber P.; Stoeckert C.; Weissman S.; Forget B.; Kazazian H. Concordance of a point mutation 5' to the $\epsilon\gamma$ globin gene with $\epsilon\gamma\beta^+$ HPFH in black population. *Blood* 64:1292-1296,1984a.
- Collins F.S.; Stoeckert C.J.Jr.; Serjeant G.R.; Forget B.G.; Weissman S.M. $\epsilon\gamma\beta^+$ -HPFH: Cosmid cloning and identification of a specific mutation 5' to the $\epsilon\gamma$ gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:4894-4898, 1984b.
- Collins F.S.; Metherall JE; Yamakawa M; Dan J; Weissman SM; Forget BG: A point mutation in the $A\gamma$ -globin gene promoter in Greek HPFH. *Nature* 313:325-326,1985.
- Collins F.S.; Cole J.L.; Lockwood W.K.; Iannuzzi M.C. The deletion in both common types of HPFH is approximately 105Kb. *Blood* 70:1797-1801,1987.
- Colombo B.; Kim B.; Perez Atencio R.; Molina C.; Terrenato L. The pattern of fetal haemoglobin disappearance after birth. *Br. J. Haematol.* 32:79-84,1976.
- Costa F.F.; Zago M.A.; Botura C. Unbalanced globin synthesis in bone marrow of beta thalassemia heterozygotes. *Thalassemia: Pathophysiology and Manegement. Birth Deffects, original article series*, 23(5A): 157-161,1988.
- Costa F.F.; Zago M.A.; Cheng G.; Nechtman J.F.; Stoming T.A.; Huisman T.H.J. The Brazilian type of nondeletional $A\gamma$ - fetal hemoglobin has a C→G substitution at nucleotide -195 of the $A\gamma$ -globin gene. *Blood* ,76:1896-1897,1990.
- Curtin P.D. *The Atlantic slave trade. A census.* The University of Wisconsin, Press, Milwaukuty, 1969.
- Curtin P.; Pirastu M.; Kan Y.W. A distant gene deletion affects β -globin gene junction in an atypical $\gamma\delta\beta$ -Thalassemia. *J.Clin.Invest.* 76:1554-1560,1985.
- Curtin P. & Kan Y.W.: The inactive β -globin gene on a $\gamma\delta\beta$ -Thal chromosome has a normal structure and functions normally *in vitro*. *Blood* 71:766-770,1988.
- Dacie J.V. & Lewis S.M.: *Practical Haematology* .6th ed. Churchill Livingsstone, Edinburgh, London, Mulbourne, New York, 1984.

- Deisseroth A.; Velez R.; Nienhuis A.W.: Hemoglobin synthesis in somatic cell hybrids: Independent segregation of the human α and β -globin chain. *Science* 191:1262-1264,1976.
- Deisseroth A.; Nienhuis A.; Turner P.; Velez R.; Anderson W.F.; Ruddle F.; Lawrence J.; Creogon R.; Keicherlapati R. Localization of the human α -globin structural gene to chromosome 16 in somatic cell hybrids by molecular hybridization assay. *Cell* 12:205-218,1977.
- Deisseroth A.; Nienhuis A.; Lawrence J.; Gelis R.; Turner P.; Ruddle F.H. Chromosomal localization of human β globin on human chromosome 11 in somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1456-1460, 1978.
- Diaz-Chico J.C.; Yang K.G.; Kutlar A.; Reese A.L.; Aksoy M.; Huisman T.H.J. An $\approx$ 300bp deletion involving part of the 5' β -globin gene region is observed in members of a Turkish family with β -Thal. *Blood*, 70:583-586,1987.
- Dierks P.; Van Ooyen A.; Mantei N.; Weissman C. DNA sequences preceding the rabbit beta-globin gene are required for formation in mouse L cells of beta-globin RNA with the correct 5'terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1411-1419,1981.
- Dierks P.; Ooyen A.; Cochran M.D.; Dobkin C.; Reiser J.; Weissmann C. Three regions upstream from the Cap site are required for efficient and accurate transcription of the rabbit beta-globin gene in mouse 3T6 cells. *Cell* 32:695-706,1983.
- DiSegni G.; Cararra G.; Tocchini-Valentini G.R.; Shoulders C.C.; Baralle F.E. Selective *in vitro* transcription of one of two Alu family repeats present in the 5'-flanking region of the human ϵ globin gene. *Nucleic Acids Res.* 9:6709-6722,1981.
- Driscoll M.C.; Dobkin C.S.; Alter B.P. $\gamma\delta\beta$ -Thalassemia due to a *de novo* mutation deleting the 5' β -globin gene activating-region hypersensitive sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7470-7474,1989.

- Efremov G.D.; Wilson J.B.; Huisman T.H.J. The chemical heterogeneity of human $A\gamma I$, hemoglobin F. Direct evidence for the existence of three types of γ -chain, the $G\gamma I$, $A\gamma I$, and $A\gamma T$. *Biochim. Biophys. Act.* 579:421-431, 1979.
- Efremov G.D.; Nikolov N.; Hattori Y.; Bakioglu I.; Huisman T.H.J. The 18-23 Kb deletion of the Macedonian $\delta\beta$ -Thal includes the entire δ and β -globin genes. *Blood*, 68 (4): 971-974, 1986.
- Efstratiadis A., Rosakony J.W.; Maniatis T.; Lawn R.M.; O'Connell C.; Spritz R.A.; De Riel J.K.; Forget B.G.; Weissman S.M.; Slighton J.L.; Blechel A.E.; Smithies O.; Baralle F.E.; Shoulders C.C.; Proudfoot N.J. The structure and evolution of the human β -globin gene family. *Cell* 21:653-668, 1980.
- Enver T.; Raich N.; Ebens A.J.; Papayannopoulou T.; Stamatoyannopoulos G. Developmental regulation of human fetal-to-adult globin gene switching in transgenic mice. *Nature (London)* 344:309-313, 1990.
- Erlich H.A. *PCR Technology- Principles and Applications for DNA amplification*. Stockton Press. New York. 1989.
- Everett R.D.; Baty D.; Chambon P. The repeated GC-rich motifs upstream from the TATA-box are important elements of SV40 early promoter. *Nucleic Acids. Res.* 11:2447-2464, 1983.
- Farquhar M.; Gelinas R.; Tatsis B.; Murray J.; Yagi M.; Muller R. Stamatoyannopoulos G. Restriction endonuclease mapping of $\gamma\delta\beta$ -globin region in $G\gamma(\beta)^+$ HPFH and Chinese $A\gamma$ -HPFH variant. *Am. J. Hum. Genet.* 35:611-620, 1983.
- Fearon E.R.; Kazazian H.H.; Waber P.G.; Lee J.I.; Antonarakis S.E.; Orkin S.H.; Vanin E.F.; Henthorn P.S.; Grosveld F.G.; Scott A.F.; Scott A.G.; Buchana G.R. The entire globin cluster is deleted in a form of $\gamma\delta\beta$ -Thal. *Blood* 61:1273-1278, 1983.
- Feingold E.A.; Collins F.S.; Metherall J.E.; Stoeckert C.J. jr; Weissman S.M.; Forget B.G. Analysis of mutations associated with deletion and nondeletion HPFH. In

- Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW(eds): *Experimental Approaches for study of hemoglobin switching*. New york, NY, Liss, p 109,1985.
- Feingold E.A.; Forget B.G. The breakpoint of a large deletion causing HPFH occurs within an erythroide DNA domain remote from the β -globin gene cluster. *Blood*,74(6):2178-2186,1989.
- Fessas P. & Stamatoyannopoulos G. HPFH in Greece. A study and a comparison. *Blood* 24:223-240,1964.
- Fischer K.D. & Nowock J. The T $\rightarrow$ C substitution at -198 of the A γ -globin gene associated with the British form of HPFH generates overlapping recognition sites for two DNA-binding proteins. *Nucl. Acids. Res.* 18: 5685-5692,1990.
- Fodde R.; Losekoot M.; Casula L.; Benini L.F. Nucleotide sequence of the Belgian G γ (A $\gamma\delta\beta$)0-Thal deletion breakpoint suggests a common mechanism for a number of such recombination events. *Genomics* 8:732-740,1990.
- Forget B.G.; Hilman D.G.; Lazarus H.; Barell E.F.; Benz E.J. Jr; Caskey C.T.; Huisman T.H.J.; Schoeder W.A.; Housman D. Absence of messenger RNA and gene DNA for for β -globin chains in HPFH. *Cell* 7: 323-329, 1976.
- Forget B.G.; Tuan D.; Biro P.A.; Jagadeewaran P.; Weissman S.M. Structural features of the DNA flanking the human non- α globin genes: Implication in the control of fetal hemoglobin switching. *Tro. Assoc. Am. Physicians.* 94:204-210,1991.
- Forrester W.C.; Thompson C.; Elder J.T.; Groudine M. A developmentally stable human β -globin gene cluster. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 83:1359-1363,1986.
- Forrester W.C.; Nowak V.; Gelinas R.; Groudine M. Molecular analysis of the human β -globin locus activation region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5439-5443,1989.
- Forrester W.C.; Epner E.; Driscoll C.; Enver T.; Brice M.; Papayannopoulou T.; Groudine M. A deletion of the human β -globin locus activation region causes a major alteration in chromatin structure and replication across the entire β -globin locus. *Genes Dev.* 4:1637-1649,1990.

- Friedman S.; Schwartz E. HPFH with β -chain synthesis in *cis* position $G\gamma$ - β ⁺-HPFH in a negro family. *Nature* 259:138-140,1976.
- Fritsch E.F.; Lawn R.M.; Maniattis T. Characterization of deletions which affect the expression of fetal globin genes in man. *Nature* 279:598-603,1979.
- Fritsch E.F.; Lawn R.M.; Maniattis T. Molecular cloning and characterization of the human β -like globin gene cluster. *Cell*:19, 959-972,1980.
- Fucharoen S.; Shimizu K.; Fukumaki Y. A novel C→T transition within the distal CCAAT motif of the $G\gamma$ -globin gene in the Japanese HPFH: Implication of factor binding in elevated fetal globin expression. *Nucl.Acids.Res.*18:5245-5253,1990.
- Gelinas R.; Endlich B.; Pfeiffer C.; Yagi M.; Stamatoyannopoulos G. G to A substitution in the distal CCAAT box of the $A\gamma$ -globin gene in Greek HPFH. *Nature* 313:323-325,1985.
- Gelinas R.; Bender M.; Lotshaw C.; Waber P.; Kazazian H.;StamatoyannopoulosG. Chinese $A\gamma$ fetal hemoglobin: C→T substitution at position -196 of the $A\gamma$ gene promoter. *Blood* 67:1717-1719,1986.
- George E.; Fariadah K.; Trent R.J. Homozygosity for a new type of $G\gamma(A\gamma\delta\beta)$ 0-Thal in a Malasyan mali. *Hemoglobin* 10:353-359,1986.
- Gianni A.M.; Bregni M.; Cappellini M.D.; Giorelli G.; Taramelli R.; Giglioni B.; Comi P.; Ottolenghi S. A gene controlling fetal hemoglobin expression in adults is not linked to the non- α -globin cluster. *EMBO J* 2:921-925,1983.
- Giglioni B.; Casini C.; Mantovani R.; Merli S.; Comi P.; Ottolenghi S.; Saglio G.; Camaschella C. A molecular study of a family with Greek HPFH and β -Thal. *EMBO J.*3:2641-2645,1984.
- Gilman J.G.; Huisman T.H.J. DNA sequence variation associated with elevated fetal $G\gamma$ globin production. *Blood* 66:783-787,1985.
- Gilman J.G.; Mishima N.; Wen X.J. Upstream promoter mutation associated with modest elevation of fetal hemoglobin expression in human adults. *Blood* 72:78-81,1988.

- Grosveld G.C.; Shewmaker C.K.; Iat P.; Flavell R.A. Localization of DNA sequences necessary for transcription of the rabbit beta-globin gene *in vitro*. *Cell*, 25:215-219,1981.
- Grosveld G.C.; de Boer E.; Shewmaker C.K.; Flavell R.A. DNA sequences necessary for transcription of the rabbit beta-globin gene *in vitro*. *Nature*, 295:120-126,1982.
- Grosveld G.C.; Blom van Assendelf G.; Greaves D.R.; Kollias G. Position-independent, high-level expression of the human β -globin gene in transgenic mice. *Cell*, 51:975-985,1987.
- Gruss P. Review: Magic enhancers?. *DNA*,3:1-9,1984.
- Guida S.; Giglioni B.; Comi P.; Ottolenghi C.; Camaschella C.; Saglio G. The β -globin gene in Sardinian $\delta\beta^0$ -Thal carries a C $\rightarrow$ T non sense mutation at codon 39. *EMBO J.*, 3: 785-787, 1984.
- Gumucio D.L.; Rood K.L.; Graytariordan M.F.; Sartor C.I.; Collins F.S. Nuclear proteins that bind the human γ -globin gene promoter. Alteration in binding produced by point mutations associated with HPFH. *Mol.Cell.Biol.*, 8:5310-5322,1988.
- Gumucio D.L.; Rood K.L.; Blanchard-McQuati K.L.; Gray F.S. Interaction of Sp1 with the human γ - globin promoter: binding and transactivation of normal and mutant promoter. *Blood*, 78(7):1853-1863,1991.
- Hanscombe O.; Whyatt D.; Fraser P.; Yannoutsos N.; Greaves D.R.; Dilson N.; Grosveld F. Importance of globin gene order for correct developmental expression. *Genes Dev.*,5:1387-1394,1991.
- Hecht F.; Motulsky A.G.; Lemire R.J.; Shepard T.E.: Predominance of hemoglobin Gower I in early human embrionic development. *Science*,152:91-92,1966.
- Henthorn P.S.; Smithies O.; Nakatsuji T. ($A\gamma\delta\beta$) 0 -thal in blacks is due to a deletion of 34Kb of DNA. *Br. J. Haematol.* 59:343-356,1985.
- Henthorn P.S.; Mager D.L.; Huisman T.H.J. A gene deletion ending within a complex array of repeated sequences 3 to the human β -globin gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:5194-5198,1986.

- Henthorn P.S.; Smithies O.; Mager D.L. Molecular analysis of deletions in the human β -globin cluster: Deletion junctions and locations of breakpoints. *Genomics* 6:226-237,1990.
- Hesse J.E.; Nickol J.M.; Lieber M.R.; Felsenfeld G. Regulated gene expression in transfected primary chickens erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:4312-4316,1986.
- Higgs D.R.; Clegg J.B.; Wood W.G.; Weatherall D.J. $G\gamma\beta^+$ type of HPFH in association with HbC. *J. Med. Genet.* 16: 288-295,1979.
- Horton B.F.; Thompson R.B.; Dozy A.M.; Nechtman C.M.; Nichols E.; Huisman T.H.J. In homogeneity of hemoglobin VI. The minor globins of cord blood. *Blood* ,20:302-313,1962.
- Houck C.M.; Rinehart F.P.; Schmid C.W. A ubiquitous family of repeated DNA sequences in the human genome. *J. Mol. Biol.*,132:289-292,1979.
- Huang H.J.; Stoming T.A.; Harris H.F.; Kutlar F.; Huisman T.H.J. The Greek $A\gamma\beta^+$ -HPFH observed in a large black family. *Am. J. Hematol.* 25:401-408,1987.
- Huehns E.R.; Dance N.; Beaven G.H.; Hecht F.; Motulsky A.G. Human embryonic hemoglobins. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*,19:327-331,1964.
- Huisman T.H.J.; Schroeder W.A.; Efremov G.D.; Duma H.; Mladevovsh B.; Hyman C.B.; Rachmiliwitz E.A.; Vouver N.; Miller A.; Brodie A.; Shelton Jr.; Shelton J.B.; Apell G. The present status of the heterogeneity of fetal hemoglobin in β -thalassemia. An attempt to unify some observations in thalassemia and related conditions. *Ann. NY Acad. Sci.*, 232: 107-124,1974.
- Huisman T.H.J.; Miller A.; Schroeder W.A. $A\gamma$ type of HPFH with β chain production in *cis*. *Am. J. Hum. Genet.* 27:765-777,1975.
- Huisman T.H.J.; Wilson J.B. Recent advances in the quantitation of human fetal hemoglobins with different γ chains. *Am. J. Hematol.* 9:225-235,1980.
- Huisman T.H.J.; Altay C. The chemical heterogeneity of the fetal hemoglobin of black newborn babies and adults: A reevaluation. *Blood*, 58:491-493, 1981a.

- Huisman T.H.J.; Altay C.; Weber B.; Reese A.L.; Gravely M.E.; Okonjo K.; Eilson J.B. Quantitation of three types of γ chain of HbF by high pressure liquid chromatography: Application of this method to the HbF patients with Sickle cell anemia or the S-HPFH condition. *Blood*, 57:75-82, 1981b.
- Jagadeeswaran P.; Pan J.; Spritz R.A.; Duncan C.A.; Biro P.A.; Tuan D.; Forget B.G.; Weissman S.M. Structures in intergenic DNA of non- α -globin genes of man. In Brown D. & Fox C.F. (eds): *Developmental Biology using purified genes*. ICN-UCLA Symp. Mol. Biol. Vol XXIII. N Y, Academic Press, pp71-84, 1981.
- Jagadeeswaran P.; Tuan D.; Forget B.G.; Weissman S.M. A gene deletion ending at the midpoint of a repetitive DNA sequence in one form of HPFH. *Nature*, 296:469-470, 1982.
- Jeffreys A.J.; Flavell R.A. The rabbit β -globin gene containing a large insert in the coding sequence. *Cell*, 12:1097-1108, 1977.
- Jelinek W.R.; Schmid C.W. Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. *Annu. Rev. Biochem.*, 51:813-818, 1982.
- Jennings M.W.; Jones R.W.; Wood W.G.; Weatherall D.J. Analysis of an inversion within the human β globin gene cluster. *Nucleic Acids Res.* 13:2897-2906, 1985.
- Johnson P.F.; McKnight S.L. Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 58: 799-839, 1989.
- Jones R.W.; Old J.M.; Trent R.J.; Clegg J.B.; Weatherall D.J. Restriction mapping of a new deletion responsible for G γ ($\delta\beta$)0-Thal. *Nucl. Acid. Res.*, 9:6813-6825, 1981a.
- Jones R.W.; Old J.M.; Trent R.J.; Clegg J.B.; Weatherall D.J. Major rearrangement in the β -globin gene cluster. *Nature*, 291:39-44, 1981b.
- Kaufman R.E.; Kretschmer P.J.; Adam J.W.; Coon H.C.; Anderson W.F.; Nienhuis A.W. Cloning and characterization of DNA sequences surrounding the human γ , δ and β -globin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4229-4233, 1980.
- Kazazian H.H. Jr.; Woodhead A.P. Hemoglobin A synthesis in the developing fetus. *N. Engl. J. Med.*, 289: 58-62, 1973.

- Keller E.B.; Noon W.A. Intron splicing: A conserved internal signal in introns pre-mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81:7417-7422, 1984.
- Khoury G. & Gruss P. Enhancer elements. *Cell*, 33: 313-314, 1983.
- Kioussis D.; Vanin E.; de Longe T.; Flavell R.A.; Grosveld F. β -globin gene inactivation by DNA translocation in $\gamma\beta$ -Thal. *Nature (London)*, 306: 662-666, 1983.
- Kollias G.; Hurst J.; de Boer E.; Grosvel F. The human β -globin gene contains a downstream developmental specific enhancer. *Nucleic Acids. Res.* 15:5739-5747, 1987.
- Kulozik A.E.; Yarwood N.; Jones R.W. The Corfu ($\delta\beta$)⁰-tal: A small deletion acts at a distance to selectively abolish β -globin gene expression. *Blood*, 71:457-462, 1988.
- Kutlar A.; Gardine M.B.; Headleu M.G.; Reese A.L.; Clerk M.P.; Nagle S.; Sukumaran P.K.; Huisman T.H.J. Heterogeneity in the molecular basis of three types of HPFH and the relative synthesis of the G γ and A γ types of γ chain. *Biochem. Genet.*, 22: 21-35, 1984.
- Lauer J.; Shen C.K.J.; Maniattis T. The chromosomal arrangement of human α -like globin genes. *Cell*, 18:,119-130, 1980.
- Lawn R.M.; Fritsch E.F.; Parker R.C.; Blake G.; Maniattis T. The isolation and - characterization of linked δ - and β -globin genes from a cloned library of human DNA. *Cell*, 15: 1157-1174, 1978.
- Lawn R.M.; Efstratiadis A.; O'Connel C.; Maniattis T. The nucleotide sequence of the human β -globin gene. *Cell*, 21: 647-651, 1980.
- Leder P.; Hansen J.N.; Konkel D.; Leder A.; Nishioka Y.; Talkington C. Mouse globin system: A functional and evolutionary analysis. *Science*, 209:1336-1344, 1980.
- Li Q.; Zhou B.; Powers P.; Enver T.; Stamatoyannopoulos G. β -globin locus activation regions: Conservation of organization, structure and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87: 8207-8211, 1990.
- Liebhaber S.A.; Goossens M.J.; Kan Y.W. Cloning and complete nucleotide sequence of human 5'-alpha globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 7054-7060, 1980.

- Lindenbaum M. & Grosveld F. An *in vitro* globin gene switching model based on differentiated embryonic stem cells. *Genes Dev.*, 4: 2075-2085, 1990.
- Losekoot M.; Fodde R.; Gerritsen E.J.A. Interaction of two different disorders in the β -globin gene cluster associated with an increased hemoglobin F production: A novel deletion type of $G\gamma(A\gamma\delta\beta)0$ -thal and a $\beta 0$ HPFH determinant. *Blood*, 77: 861-869, 1990.
- Mager D.L.; Henthorn P.S.; Smithies O. A chinese $G\gamma+(A\gamma\delta\beta)0$ -Thal deletion: Comparison to other deletions in the human β -globin gene cluster and sequence analysis of the breakpoints. *Nucleic Acids. Res.*, 13:6559-6575, 1985.
- Maniatis T.; Fritsch E.F.; Sambrook J. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory- 2nd ed. 1989.
- Mantovani R.; Malgaretti N.; Nicolis S.; Ronchi A.; Giglioni B.; Ottolenghi S. The effects of HPFH mutations in the human γ -globin promoter on binding of ubiquitous and erythroid-specific nuclear factors. *Nucl. Acid. Res.*, 16:7783-7797, 1988.
- Matsunaga E.; Kimura A.; Yamaha H.; Fukumakki Y.; Takagi Y. A novel deletion in $\delta\beta$ -Thal found in Japan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 126:185-191, 1985.
- Martin D.; Tsai S.; Orkin S. Increased γ -globin expression in a non deletion HPFH is mediated by an erythroid specific DNA-binding factor. *Nature*, 338:435-438, 1989.
- Martins C.S.B. *Caracterização Molecular de heterozigotos da Talassemia β* . Tese de Doutorado . Universidade Estadual de Campinas. 1993.
- Martinez G.; Hernandez A.; Corral L.; Muniz A.; Alaez C.; Serra A.; Alfarano A.; Saglio G.; Camaschella C. Molecular characterization of HPFH in a patient from Cuba. *Blood*, 76(6):11262-1263, 1990.
- Mathis D.J.; Chambon P. The S40 early region TATA box is required for accurate *in vitro* initiation of transcription. *Nature*, 290:310-315, 1981.
- McKnight S.L. Functional relationships between transcriptional control signals of the thymidine kinase gene of Herpes Simplex Virus. *Cell*, 31:355-365, 1982a.

- McKnight S.L. & Kingsbury R. Transcriptional control signal of a eukaryotic control signal of a eukaryotic protein-coding gene. *Science*, 217:316-320, 1982b.
- Mellon P.; Parker V.; Gluzman Y.; Maniatis T. Identification of DNA sequences required for transcription of the human α -globin gene in a new SV40 host-vector system. *Cell*, 27:279-282, 1981.
- Michelson A.M. & Orkin S.H. The 3'untranslated regions of the duplicated human α -globin genes are unexpectedly divergent. *Cell*, 22: 321-337, 1980.
- Miesfeld R.; Krytal M. and Arnheim N. A number of a new repeated sequence family which is conserved throughout eucaryotic evolution is found between the human δ and β -globin genes. *Nucleic. Acids. Res.* 9:5931-5938, 1981.
- Mishima N.; Londman H.; Huisman T.H.J.; Gilman J.G. The DNA deletion in an Indian $\delta\beta$ -thalassemia begins one Kb from the $A\gamma$ globin gene and ends in an L1 repetitive sequence. *Br. J. Haematol.*, 73:375-379, 1989.
- Mishima N. & Gilman J.G. Sequence feature of DNA 10-16Kb 3' of the β -globin gene that contains the 3' end point of the Indian $(\delta\beta)0$ and black $(A\gamma\delta\beta)0$ -Thal deletions. *Blood*, 76(Suppl 1):69a, 1990.
- Mitchell P.J. & Tjian R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*, 245:371-378, 1989.
- Miyoshi K.; Kaneto Y.; Kawai H.; Huisman T.H.J. X-linked dominant control of F-cells in normal adult life. *Blood*, 72:1854-1862, 1988.
- Mullis K.B. & Faloona F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed reaction. *Methods Enzymol.*, 155: 335-345, 1987.
- Nakatsuji T.; Gilman J.G.; Sukumava P.K. Restriction endonuclease gene mapping studies of an Indian $(A\gamma\delta\beta)0$ -Thal, previously identified as $G\gamma$ -HPFH. *Br. J. Haematol.* 57:663-670, 1984.

- Ney P.A.; Sorrentino B.P.; Mc Donagh K.T.; Nienhuis A.W. Tandem AP-1 binding sites within the human β -globin dominant control region function in erythroid cells. *Genes. Dev.*, 4: 993-1006, 1990.
- Nicholls R.D.; Fischel-Ghodsion W.; Higgs D.R. Recombination at the human α -globin gene cluster: Sequence features and topological constraints. *Cell*, 49:369-378, 1987.
- Novelletto A.; Di Rienzo A.; Martinez G.; Ferreira R.; Colombo B. A further case of $\text{G}\gamma\beta^+$ -HPFH associated to the -202 C $\rightarrow$ G mutation in the $\text{G}\gamma$ promoter region. *Hemoglobin*, 11(4):389-393, 1987.
- Orkin S.H.; Alter B.; Altay C. Deletion of the $\text{A}\gamma$ gene in $\text{G}\gamma$ - $\delta\beta$ -Thal. *J. Clin. Invest.*, 64:866-869, 1979.
- Orkin S.H.; Goff S.C.; Nathan D.G. Heterogeneity of DNA deletion in $\gamma\delta\beta$ -Thal. *J. Clin. Invest.* 67: 878-884, 1981.
- Orkin S.H. Globin gene regulation and switching: Circa 1990. *Cell*, 63:665-672, 1990.
- Old J.M.; Ayyub H.; Wood W.G.; Clegg J.B.; Weatherall D.J. Linkage analysis of nondeletion HPFH. *Science*, 215: 981-982, 1982.
- Ottolenghi S.; Giglioni B.; Coni P.; Gianni A.M.; Polli E.; Acquaye C.T.A.; Oldhnm J.A.; Masera G. Globin gene deletion in HPFH, $\delta\beta$ -thal and Hb Lepore disease. *Nature*, 278:654-657, 1979.
- Ottolenghi S.; Giglioni B.; Taramelli R.; Coni P.; Mazza U.; Saglio G.; Camaschella C.; Izzo P.; Cao A.; Galanello R.; Gimferrer E.; Baiget M.; Gianni A.M. Molecular comparison of $\delta\beta$ -Thalassemia and HPFH DNAs: Evidence of a regulatory area? *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 79:2347-2351, 1982.
- Ottolenghi S.; Giglioni B.; Pulazzini A.; Coni P.; Camaschella C.; Serra A.; Guerrasio A.; Saglio G. Sardinian $\delta\beta$ -Thal: A further example of a C to T substitution at position -196 of the $\text{A}\gamma$ globin gene promoter. *Blood*, 69:1058-1061, 1987.

- Ottolenghi S.; Camaschella C.; Coni P.; Giglioni B.; Longinotti M.; Oggiano L.; Dore F.; Sciarratta G.; Saglio G.; Serra A.; Loi A.; Pirastu M. A frequent $A\gamma$ -HPFH in Northern Sardinian. Its molecular basis and haematological phenotype in heterozygote with $-\beta$ -thal. *Hum. Genet.* 79:13-17,1988a.
- Ottolenghi S.; Nicholis S.; Taramelli R.; Margaretti N.; Mantovani R.; Coni P.; Giglioni B.; Longinotti M.; Dori F.; Oggiano L.; Pistidda P.; Serra A.; Camaschella C.; Saglio G. Sardinian $G\gamma$ -HPFH: A T $\rightarrow$ C substitution in a conserved "octamer" sequence in the $G\gamma$ -globin promoter. *Blood* 71 (3):815-817,1988b.
- Ottolenghi S.; Mantovani R.; Nicolis S.; Ronchi A.; Giglioni B. DNA sequences regulating human globin gene transcription in nondeletional HPFH. *Hemoglobin*, 13(6):523-541,1989.
- Pataryas H.; Stamatoyannopoulos G. Hemoglobin in human fetuses: Evidence for adult hemoglobin production after the 11th gestational week. *Blood*,39:688-696,1972.
- Pembrey M.E.; Wood W.D.; Weatherall D.J.; Perrine R.P. Fetal haemoglobin production and the sickle gene in the oasis of eastern Saudi Arabia. *Br. J. Haematol.*, 40:415-429,1978.
- Perrine R.P.; Pembrey M.E.; John P. Natural history of sickle cell anaemia in Saudi Arabs: A study of 270 subjects. *Ann. Inter. Med.* 88:1-10,1978.
- Philipsen S.; Talbot D.; Fraser P.; Grosveld F. The β -globin dominant control region: HS2. *EMBO J.*,9:2159-2167,1990.
- Pirastu M.; Kan Y.W.; Lin C.C.; Baine R.M.; Tate Holbrook C. Hemolytic disease of the newborn caused by a new cluster. *J. Clin. Invest.*, 72:602-609,1983.
- Pirastu M.; Kan Y.W.; Ganello R.; Cao A. Multiple mutations produce $\delta\beta^0$ -thalassemia in Sardinia. *Science*,223:929-930,1984.
- Ponez M.; Solowiejczyk D.; Harpel B.; Mory Y.; Schwartz E.; Surrey S. Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood. Analysis of β -like globin genes. *Hemoglobin*, 6:27-36,1982.

- Ponez M.; Sutton M.; Delgrosso K.; Schwartz E.; Surrey S. DNA methylation in HPFH-2. *Nucleic Acids. Res.*, 13: 5169-5172, 1987.
- Popovich B.W.; Rosenblatt D.S.; Kendall A.G.; Nishioka Y. Molecular characterization of an atypical β -thal caused by a large deletion in the 5' β -globin gene region. *Am. J. Hum. Genet.*, 39:797-800, 1986.
- Proudfoot N.J. Eukaryotic promoters? *Nature*, 279:376-382, 1979.
- Proudfoot N.J. & Maniatis T. The structure of a human α -globin pseudogene and its relationship to α -globin gene duplication. *Cell*, 21: 537-544, 1980.
- Proudfoot N.J.; Ged A.; Maniatis T. The structure of the human ζ -globin gene and a closely linked, nearly identical pseudogene. *Cell*, 31:553-563, 1982..
- Raich N.; Papayannopoulou T.; Stamatoyannopoulos G.; Enver T. Demonstration of a human ϵ -globin gene silencer with studies in transgenic mice. *Blood*, 79:861-864, 1992.
- Razian A.; Webb C.; Szyf M.; Yisraeli J.; Rosenthal A.; Naveh-Many T.; Sciaky-galli N.; Cedar H. Variations in DNA methylation during mouse cell differentiation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81: 2275-2282, 1984.
- Reed R.; Maniatis T. Intron sequences involved in lariat formation during pre-mRNA splicing. *Cell*, 41:95, 1985.
- Ronchi A.; Nicholis S.; Santro C.; Ottolenghi S. Increased Sp1 binding mediates erythroid specif overexpression of a mutated (HPFH) γ -globin promoter. *Nucl. Acids. Res.* 24: 10231-10241, 1989.
- Ryan T.M.; Behringer R.R.; Townes T.M.; Palmiter R.D.; Brinster R.L. High level erythroid expression of human α -globin genes in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:37-41, 1989.
- Ryan T.M.; Behringer R.R.; Martin N.C.; Townes T.M.; Palmiter R.D.; Brinster R.L. A single erythroide-specific DNaseI superhypersensitive site activates high levels of human β -globin gene expression in transgenic mice. *Genes Dev.* 3: 314-123, 1989.

- Saglio G; Ricco G; Mazza V; Camaschella C; Pich PG; Gianni AM; Gianazza E; Righetti PG; Gigioni B; Comi P; Gusmeroli M; Ottolenghi S: Human γ -globin chain is a variant of $A\gamma$ chain ($A\gamma$ Sardinia). *Proc. Natl. Acad. USA*, 76:3420-3424,1979.
- Saglio G; Camaschella C; Serra A; Bertero T; Resecambrian G;Guerrasio A; Mazza U; Izzo P; Terragni F; Giglioni B; Comi P; Ottolenghi S. Italian type of deletional HPFH. *Blood*, 68:646-651, 1986.
- Saiki R.K.; Bugawan T.L.; Horn G.T.; Mullis K.B.; Erlich H.A. Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA DQ- α DNA with allele-specific oligonucleotide probes.*Nature*, 324: 163-166, 1985.
- Saiki R.K.; Geelfond D.H.; Stoffel S.; Scharf S.J.; Higuchi R.; Horn G.T.; Mullis K.B.; Erlich H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491,1988.
- Schroeder W.A.; Huisman T.H.J.; Shelton J.R.; Shelton J.B.; Kleihauer E.F.; Dozy A.M.; Robberson B. Evidence for multiple structural genes for the γ chain of human fetal hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 60:537-544,1968.
- Shafit-Zagardo B.; Brown E.L.; Maio J.J.; Adams J.W. KpnI families of long, intersperseed repetitive DNAs associated with the human β -globin gene cluster. *Gene*, 20:397-399, 1982.
- Shen S-H.; Slightonn J.L.; Smithies O. A history of the human fetal globin gene duplication. *Cell*,26:191- 200,1981.
- Shiokowa S.; Yamada H.; Taki hard Y. Molecular analysis of a japanese $\delta\beta^0$ -thal. *Blood*, 72: 1771-1775,1988.
- Shepard M.K.; Weatherall D.J.; Conley C.L. Semi-quantitative estimatioon of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. *Bull. Johns. Hopkins. Hosp.*, 110:293-310, 1962.

- Slightom J.L.; Blechl A.E.; Smithies O. Human fetal γ and $\text{A}\gamma$ globin genes: complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes. *Cell*, 21: 627-638, 1980.
- Sofroniadou K.; Wood W.G.; Nute P.E.; Stamatoyannopoulos G. Globin chain synthesis in the Greek type ($\text{A}\gamma$) of HPFH. *Br. J. Haematol.* 29: 137-142, 1975.
- Sonati M.F. *Talassemia α com deficiência gênica em uma população negróide brasileira*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. 1990.
- Spritz R.A.; DeRiel J.K.; Forget B.G.; Weissman T. The nucleotide sequence of the human β -globin gene. *Cell* 21: 647, 1980.
- Spritz R.A. & Orkin S.H. Duplication followed by deletion accounts for the structure of an Indian deletion β^0 -thal gene. *Nucleic. Acids. Res.*, 13: 2897-2900, 1985.
- Stamatoyannopoulos G.; Wood W.G.; Papayannopoulou T. A new form of HPFH in blacks and its association with sickle cell trait. *Blood*, 46:683-687, 1975.
- Stamatoyannopoulos G.; Nienhuis A.W.; Leder P.; Majerus P.W. *The molecular Basis of Blood Diseases*. Philadelphia, PH: WB. Saunders Company, 1987.
- Stamatoyannopoulos G. & Nienhuis A.W. *Hemoglobin Switching. Part A: Transcriptional Regulation*. Progress in clinical and Biological Research volume 316A. New York. Alen R. Liss, INC. 1988a.
- Stamatoyannopoulos G. & Nienhuis A.W. *Hemoglobin Switching Part B: Cellular and Molecular Mechanisms*. Progress in Clinical Biological Research volume 316B. New York. Alen R. Liss, INC. 1988b.
- Stoeckert Jr C.J.; Meetherall J.E.; Yamakawa M.Y.; Eissenstadt J.M.; Weissman S.M.; Forget B.G. Expression of the affected $\text{A}\gamma$ -globin gene associated with Greek nondeletion HPFH. *Mol. Cell. Biol.* 7(8): 2999-3003, 1987.
- Stoeckert Jr. C.J. Retroviral transfer of a human fetal globin gene carrying the -202 $\text{G}\gamma\beta^+$ -HPFH mutation into the human erythroleukemia line KMOE. *Hemoglobin*, 15(4):257-268, 1991.

- Stoming T.A.; Stoming G.S.; Lanclos K.D.; Nute P.E.; Huisman T.H.J. An $A\gamma$ type of nondeletional HPFH with a T→C mutation at position -175 to the Cap site of the $A\gamma$ -globin gene. *Blood*, 73:329, 1989.
- Superti-Furga G.; Bartberi A.; Schaffner G.; Busglinger M. The -117 mutation in Greek HPFH affects the binding of three nuclear factors to the CCAAT region of the γ -globin gene. *EMBO J.* 7: 3009, 1988.
- Surrey S.; DelGrosso K.; Malladi P.; Schwartz E. A single base change at position -175 in the 5'flanking region of the $G\gamma$ -globin gene from a black with $G\gamma\beta^+$ -HPFH. *Blood* 71: 807, 1988.
- Sykes K. & Kaufman R. A naturally occurring γ -globin gene mutation enhances Sp1 binding activity. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 95, 1989.
- Talbot D.; Collis P.; Antoniu M.; Vidol M.; Grosveld F.; Graves D.R. A dominant control region from the human β -globin locus conferring integration site-dependent expression. *Nature*, 338:352-355, 1989.
- Talbot D.; Philipsen S.; Fraser P.; Grosveld F. Detailed analysis of the site 3' region of the human β -globin dominant control region. *EMBO J.* 9: 2169-2178, 1990.
- Taramelli R.; Kioussis D.; Vanin E.; Bartram K.; Groffen J.; Hurst J.; Grosveld F. $\gamma\delta\beta$ -thal 1 and 2 are the result of a 1000Kb deletion in the human β -globin cluster. *Nucleic Acids Res.*, 14: 7017-7029, 1986.
- Tate V. E.; Wood W.; Weatherall D.J. The British form of HPFH results from a single base pair mutation adjacent to an S1 hypersensitive site 5' to the $A\gamma$ -globin gene. *Blood*, 68:1389-1393, 1986.
- Tilghman S.M.; Tiemeier D.C.; Polsky F.; Edgell M.H.; Seidman J.G.; Leder A.; Enquist L.W.; Normon B.; Leder P. Cloning segments of the mammalian genome: Bacteriophage λ contains mouse globin and surrounding gene sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74:4406-4410, 1977.

- Trent R.J.; Jones R.W.; Clegg J.B.; Weatherall D.J.; Davidson R.; Wood W.G. ($\text{A}\gamma\delta\beta$) α -thal: Similarity of phenotype in four different molecular defects including one newly described. *Br.J. Haematol.*, 57:279-289, 1984.
- Trent R.J.; Suirklis L.; Jones P. Thai ($\delta\beta$) α -thal and its interaction with γ -thal. *Hemoglobin*, 12:101-110, 1988.
- Trent R.J.; Williams B.G.; Keane A. Molecular and hematologic characterization of Scottish-Irish type ($\epsilon\gamma\delta\beta$) α -Thal. *Blood* 76: 2132- 2139, 1990.
- Trudell M. & Constantini F. A 3'enhancer contributes to the stage-specific expression of the human β -globin gene. *Genes Dev.*, 1:954-961, 1987.
- Tsai S.; Martin D.; Zon I.; D'Andrea A.D.; Wong G.; Orkin S. H. Cloning of the cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature*, 339: 446-451, 1989.
- Tuan D.; Biro P.A.; de Riel J.K.; Lazarus H.; Forget B.G. Restriction endonuclease mapping of the γ -globin gene loci. *Nucl. Acids. Res.*, 6:2519-2544, 1979.
- Tuan D.; Murnane M.J.; de Riel J.K.; Forget B.G. Heterogeneity in the molecular basis of HPFH. *Nature*, 285:335-337, 1980.
- Tuan D.; Feingold E.; Newman M.; Weissman S.M.; Forget B.G. Different 3'-end points of deletions causing $\delta\beta$ -Thalassemia and HPFH: Implication for the control of γ -globin gene expression in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:6937-6941, 1983.
- Tuan D.; Solomon W.; Li Q.; London I.M. The " β -like-globin" gene domain in human erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 6384-6388, 1985.
- Van der Ploeg L.H.T.; Konings A.; Oort M.; Roos D.; Bernini L.; Flavell R.A. $\gamma\beta$ -Thal studies showing that deletion of the γ and β genes influences β -globin gene expression in man. *Nature (London)*, 283: 637-642, 1980.
- Vanin E.F.; Henthorn P.S.; Kloussis D.; Grosveld F.; Smitjies O. Un expected relationships between four large deletions in the human β -globin gene cluster. *Cell*, 35: 701-709, 1983.

- Weatherall D.J.; Cartner R.; Wood W.G. A form of HPFH characterized by uneven cellular distribution of haemoglobin F and the production of haemoglobin A and A₁, in homozygotes. *Br. J. Haematol.* 29: 205-210, 1975.
- Weatherall D.J. & Clegg J.B. *The Thalassemia Syndromes* (ed3). Oxford, England, Blackwell, 1981.
- Wood W.G.; Stamatoyannopoulos G.; Lim G.; Nute P.E. F-cells in the adult: Normal values and levels in individuals with hereditary and acquired elevations of HbF. *Blood*, 446:671-680, 1975.
- Wood W.G.; Weatherall D.J.; Clegg J.B. Interaction of HPFH with β -Thal and sickle cell anaemia. *Nature*, 264: 247-249, 1976.
- Wood W.G.; Weatherall D.J.; Clegg J.B.; Hamblin T.J.; Edwards J.H.; Barlow A.M. Heterocellular HPFH and its interaction with β -thalassemia. *Br. J. Haemat.*, 36: 461-463, 1977.
- Wood W.G.; Clegg J.B.; Weatherall D.J. HPFH and $\delta\beta$ -Thalassemia. *Br. J. Haemat.*, 43: 509-520, 1979.
- Yang K.G.; Stoming T.A.; Fei Y. J.; Liang S.; Wong S.C.; Masala R.B.; Huang, C.B. Wei, Z.P.; Huisman T.H.J. Identification of base substitutions in the promoter regions of the $A\gamma$ and $G\gamma$ -globin genes in $A\gamma$ - (or $G\gamma$) β^+ -HPFH heterozygotes using the DNA-amplification-synthetic oligonucleotide procedure. *Blood* (71) 5: 1414-1417, 1988.
- Zeng Y-T.; Huang S-Z.; Chen B.; Liang Y-C.; Chang Z-M.; Herano T.; Huisman T.H.J. HPFH or ($\delta\beta$)⁰-thal. Three types observed in South Chinese families. *Blood* 66: 1430-1435, 1985.
- Zhang J-W.; Stamatoyannopoulos G.; Anagou P. Loatian ($\delta\beta$)⁰-Thal: Molecular characterizations of a novel deletion associated with increased production of HbF. *Blood*, 72(3):983-988, 1988.