

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
HEMOGLOBINOPATIAS RARAS ASSOCIADAS AO
AGRUPAMENTO GÉNICO DA BETA-GLOBINA**

Emília Sofia Félix Fernandes

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
HEMOGLOBINOPATIAS RARAS ASSOCIADAS AO
AGRUPAMENTO GÉNICO DA BETA-GLOBINA**

Dissertação orientada pela Doutora Paula Faustino (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge) e
Professor Doutor Rui Gomes (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa)

Emília Sofia Félix Fernandes

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA

2010

Agradecimentos

Primeiramente, ao Doutor João Lavinha, responsável pela Unidade de Investigação e Desenvolvimento do Departamento de Genética do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), e ao Professor Doutor José Pereira Miguel, Presidente do Conselho Directivo do INSA, por avalizarem a realização deste trabalho pela minha pessoa.

Em especial, à Doutora Paula Faustino por ter acreditado na minha capacidade para realizar o trabalho, pelo seu interesse e incentivo constante, e pela sua crucial orientação científica, sem a qual não poderia prescindir nesta nova etapa da minha formação académica.

Agradeço ao Professor Doutor Rui Gomes por ter aceitado orientar-me neste projecto de investigação.

Aos meus colegas de laboratório, Andreia, Bruno, Lina e Rute, agradeço o bom ambiente de trabalho, a boa disposição, a amizade e a entreaajuda. Com eles aprendi que a ciência tem mais encanto quando as descobertas são partilhadas com pessoas que vivem com o mesmo espírito de entusiasmo. Obrigada!

Agradeço também a todos os meus amigos pela sua amizade, pelos bons momentos passados em conjunto, pelas conversas apaziguadoras em momentos mais difíceis, e ainda por acreditarem piamente no meu sucesso. Particularmente quero agradecer ao meu Tio Manuel pela sua presença e confiança em mim, e ao Paulo, pelo seu apoio incondicional.

Com muito amor, dedico esta dissertação aos meus queridos pais. Eles semearam em mim todos os princípios de valor, o sentido de responsabilidade, a vontade de trabalhar e de dar o meu melhor. Agradeço-vos do fundo do meu coração... Muito obrigada.

Abreviaturas

A	Adenina
A + T	Conteúdo em adenina e timina, expresso em percentagem
BSA	Albumina Sérica Bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
C	Citosina
Cd	Codão
CHGM	Concentração de Hemoglobina Globular Média
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleósidos trifosfatados
C + G	Conteúdo em guanina e citosina, expresso em percentagem
G. V.	Glóbulos Vermelhos
Hb	Hemoglobina
HBA	Gene α -globina
HBB	Gene β -globina
HBD	Gene δ -globina
HBG1	Gene A^{γ} -globina
HBG2	Gene G^{γ} -globina
HGM	Hemoglobina Globular Média
HS	Locais hipersensíveis à acção da enzima DNase I
G	Guanina
IVS	Intrão (<i>Intervening Sequence</i>)
kb	Quilobases
LCR	Região de controlo de <i>locus</i> (<i>Locus Control Region</i>)
Mb	Megabase
MCS	Sequências conservadas multi-espécies (<i>Multispecies Conserved Sequences</i>)
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
nt	Nucleótidos
pb	Par de bases
PCR	Reacção de polimerização em cadeia (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RNA	Ácido ribonucléico
Rpm	Rotações por minuto
T	Timina
Tm	Temperatura de desnaturação
VGM	Volume Globular Médio
RDW	<i>Red Cell Distribution Width</i>

Resumo

A hemoglobina (Hb) é a proteína do sangue responsável pelo transporte de oxigénio para todos os tecidos do organismo. As suas quatro subunidades proteicas - as globinas - são codificadas nos agrupamentos génicos α - e β -globina, localizados respectivamente no cromossoma 16 (16p13.3) e 11 (11p15.5).

Alterações moleculares nos genes globínicos ou nas suas regiões regulatórias, podem dar origem a uma patologia designada, genericamente, por hemoglobinopatia. Esta inclui as talassémias, resultando de alterações moleculares diversas que reduzem ou anulam a expressão de um ou mais genes globínicos, apresentando, os indivíduos portadores, um fenótipo hematológico típico.

Neste trabalho foram seleccionados 20 indivíduos com fenótipo hematológico indicativo de hemoglobinopatia cuja causa molecular não era até então conhecida. Foi realizado, recorrendo a várias metodologias, incluindo a nova metodologia de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), sequenciação automática e *gap*-PCR, o estudo do agrupamento génico β -globina destes indivíduos, com a finalidade de caracterizar molecularmente a sua patologia.

Foram detectadas neste estudo mutações pontuais raras já descritas (HBG1:c.-211C>T e HBG1:c.-248C>G) e a duplicação do gene γ -globina, que justificaram a elevada percentagem atípica da hemoglobina fetal apresentada por alguns indivíduos. Foram também caracterizadas duplas heterozigóticas (HBD:c.82G>T e HBB:c. 92+1G>A ou HBB:c.118C>T) em indivíduos cujo fenótipo hematológico poderia induzir a um diagnóstico talassémico erróneo. Foram ainda caracterizadas quatro deleções diferentes: duas já descritas (NG_000007.3:g.59478_144395del84918 e NG_000007.3:g. 57237_64443 del7207), uma provavelmente nova que remove pelo menos 3kb da região 3' do agrupamento génico β -globina, e uma outra ainda não descrita, do tipo $\epsilon\gamma\delta\beta^0$ -talassémica, em que todo o agrupamento e alguns genes a jusante estão ausentes (numa extensão máxima de 208kb).

Com este trabalho foi possível esclarecer a base molecular de vários casos clínicos com fenótipos atípicos de hemoglobinopatia, o que permitiu incrementar o conhecimento científico na fisiopatologia desta doença e na compreensão da complexa regulação da expressão dos genes globínicos.

Summary

Hemoglobin is the blood's protein responsible for the transport of oxygen to all tissues of the organism. It has four proteic subunits - the globins – are encoded in α - and β -globin gene clusters on chromosome 16 (16p13.3) and 11 (11p15.5) respectively.

Molecular modifications in globin genes or in their regulatory regions may give rise to a pathology named hemoglobinopathy. This includes the thalassemias caused by diverse molecular alterations which reduce or abolish the expression of one or more globin genes, resulting in a typical hematologic phenotype.

In this work we selected 20 individuals presenting a typical hemoglobinopathy phenotype, which molecular cause was still not known. The study of the β -globin gene cluster of these individuals involved many methodologies, including the new methodology of MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), automated sequencing and *gap*-PCR, with the purpose of molecularly characterize the pathology presented by them.

Rare point mutations already described (HBG1:c.-211C>T and HBG1:c.-248C>G) and γ -globin gene duplication, explaining the higher level of fetal hemoglobin presented by some individuals. Double heterozygotes were also characterized (HBD:c.82G>T and HBB:c.92+1G>A or HBB:c.118C>T) in individuals whom hematologic phenotype could bring to a false thalassemic diagnosis. In addition, four different deletions were characterized: two already described (NG_000007.3:g.59478_144395 del84918 and NG_000007.3:g.57237_64443 del7207), one probably new which removes at least 3kb of the 3' region of the β -globin gene cluster, and new $\epsilon\gamma\delta\beta^0$ -thalassemic deletion, in which the entire cluster and some downstream genes are deleted (less than 208kb long).

With this study it was possible to clear the molecular base of some clinic cases with atypical hemoglobinopathy phenotype, contributing to increment the scientific knowledge in the fisiopatology of this disease and in the comprehension of the complex regulation of the globin genes expression.

Índice

Agradecimentos	ii
Abreviaturas	iii
Resumo	iv
Summary	v
Índice	vi
Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	ix
I. Introdução	1
I. 1 Os agrupamentos dos genes globínicos	1
I. 1. 1. Agrupamento génico α -globina	1
I. 1. 2. Agrupamento génico β -globina	2
I. 2. Expressão diferencial dos genes globínicos ao longo do desenvolvimento	3
I. 3. Regulação da expressão dos genes globínicos	4
I. 3. 1. Regulação da expressão dos genes globínicos do tipo beta-globina	4
I. 3. 2. Regulação da expressão dos genes fetais (γ -globina)	5
I. 4. Hemoglobinopatias	6
I. 4. 1. α -talassémias	6
I. 4. 2. β -talassémias	7
I. 4. 2. 1. Diagnóstico laboratorial	8
I. 4. 3. δ - e $\delta\beta$ -talassémias	8
I. 4. 4. $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talassémias	9
I. 4. 5. Persistência hereditária da hemoglobina fetal – HPFH (<i>Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin</i>)	9
I. 4. 5. 1. HPFH deleccional	9
I. 4. 5. 2. HPFH não deleccional	9
I. 4. 6. Modificadores genéticos dos fenótipos talassémicos	10
II. Objectivos	11
III. Metodologia Experimental	12
III. 1. Extracção e quantificação de DNA	12
III. 2. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>), <i>gap</i> -PCR e <i>long</i> -PCR	12
III. 3. Purificação dos produtos de PCR e <i>gap</i> -PCR	13
III. 4. Sequenciação automatic	13
III. 5. RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>)	13
III. 6. MLPA (<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>)	13
III. 6. 1. Procedimento experimental	14
III. 6. 2. Análise dos resultados	14

III. 6. 3. Construção de sondas sintéticas	15
IV. Resultados e Discussão	16
IV. 1. Indivíduos talassêmicos com HbA ₂ normal ou diminuída	16
IV. 2. Indivíduos talassêmicos com HbF elevada (HPFH)	18
IV. 2. 1. E com HbA ₂ elevada	18
IV. 2. 2. E com HbA ₂ normal	22
IV. 3. Indivíduos não talassêmicos com HbF elevada (HPFH)	26
V. Conclusão	28
VI. Perspectivas futuras	29
VII. Referências Bibliográficas	30

Índice de Figuras

I. Introdução

- Figura I .1. Estrutura da hemoglobina.
- Figura I .2. Esquema representativo dos agrupamentos génicos α - e β -globina.
- Figura I .3. Síntese das diferentes cadeias globínicas ao longo da ontogenia humana.

IV. Resultados e Discussão

- Figura IV. 1. Sequenciação da região 5' do gene δ -globina. Hb Yialousa, variante da cadeia δ -globina detectada nos indivíduos nº1 e 2.
- Figura IV. 2. Perfil de amplificação das sondas MLPA do indivíduo nº3. Imagem do gel de agarose correspondente ao *gap*-PCR para a deleção Corfu.
- Figura IV. 3. Sequenciação do promotor do gene γ -globina. HPFH Cretan, mutação C>T na posição -158 detectada nos indivíduos nº4 e 5. Perfil de amplificação das sondas MLPA do indivíduo nº4.
- Figura IV. 4. Perfil de amplificação das sondas MLPA dos indivíduos nº7 e 8.
- Figura IV. 5. Imagem do gel de agarose do *gap*-PCR para mapear a deleção a 3' do agrupamento génico β -globina dos indivíduos nº7 e 8.
- Figura IV. 6. Árvore genealógica do indivíduo nº11. Perfil de amplificação das sondas MLPA do indivíduo nº11 e 11a.
- Figura IV. 7. Sequenciação do promotor do gene γ -globina. HPFH Brasileira, mutação C>G na posição -195 detectada nos indivíduos nº13, 17, 17a, 18, 18a e 19.
- Figura IV. 8. Perfil de amplificação das sondas MLPA dos indivíduos nº14 e 15.
- Figura IV. 9. Perfil de amplificação das sondas MLPA do indivíduo nº16.
- Figura IV. 10. Esquema do agrupamento génico β -globina e dos genes de receptores olfactivos, e representação das deleções identificadas neste estudo.

Anexos

- Figura B. 1. Esquema representativo do agrupamento génico β -globina e localização dos polimorfismos analisados.
- Figura B. 2. Esquema da metodologia de MLPA.
- Figura C. 1. Ensaio controlo normais para a implementação da técnica de MLPA
- Figura C. 2. Ensaio controlo positivos para a implementação da técnica de MLPA.
- Figura D. 1. Esquema dos locais de hibridação das sondas MLPA, comerciais e sintéticas no cromossoma 11p15.5.

Índice de Tabelas

I. Introdução

- Tabela I. 1. Valores hematológicos de referência para indivíduos adultos normais e para portadores de β -talassémia

IV. Resultados e Discussão

- Tabela IV. 1 Perfil hematológico de indivíduos com alterações moleculares nos genes δ - e/ou β -globina
- Tabela IV. 2. Perfil hematológico de indivíduos α - ou β -talassémicos com HbA₂ e HbF elevada
- Tabela IV. 3. Perfil hematológico de indivíduos α - ou β -talassémicos com HbF elevada, mas HbA₂ normal
- Tabela IV. 4. Perfil hematológico de indivíduos não talassémicos com HPFH

Anexos

- Tabela A. 1 Oligonucleótidos iniciadores, mistura de reacção e condições de PCR utilizadas na amplificação da região 5' do gene β -globina
- Tabela A. 2 Oligonucleótidos iniciadores, mistura de reacção e condições de PCR utilizadas na amplificação da região 3' do gene β -globina
- Tabela A. 3 Oligonucleótidos iniciadores, mistura de reacção e condições de PCR utilizadas na amplificação da região 5' do gene δ -globina
- Tabela A. 4 Oligonucleótidos iniciadores, mistura de reacção e condições de PCR utilizadas na amplificação do promotor do gene γ^G -globina
- Tabela A. 5 Oligonucleótidos iniciadores, mistura de reacção e condições de PCR utilizadas na amplificação do promotor do gene γ^A -globina
- Tabela A. 6 Oligonucleótidos iniciadores, mistura de reacção e condições de PCR utilizadas na pesquisa da deleção Corfu
- Tabela A. 7 Oligonucleótidos iniciadores, mistura de reacção e condições de PCR utilizadas na pesquisa da deleção a 3' do agrupamento génico β -globina
- Tabela B. 1 Principais haplótipos encontrados na região do Mediterrâneo
- Tabela B. 2 Oligonucleótidos iniciadores, T_m, condições da reacção de ligação e de extensão de cada polimorfismo
- Tabela B. 3 Mistura de reacção, quantidade de reagente e condições de PCR
- Tabela B. 4 Tamanho dos fragmentos de DNA após a digestão enzimática
- Tabela D. 1 Identificação, sequência e localização das sondas MLPA sintéticas

I. INTRODUÇÃO

A hemoglobina é uma proteína do sangue presente nos eritrócitos, cuja função é o transporte de oxigénio no organismo. Esta proteína globular de estrutura quaternária é constituída por quatro cadeias globínicas, duas do tipo alfa (α) e duas do tipo beta (β), e cada uma delas contém no centro um grupo heme ao qual se liga o oxigénio, mais especificamente ao átomo de ferro na sua forma ferrosa (Figura I. 1.). A hemoglobina é também uma proteína alostérica uma vez que a ligação e libertação do oxigénio é regulada pelas alterações na estrutura da proteína, aquando da ligação do oxigénio ao grupo heme.

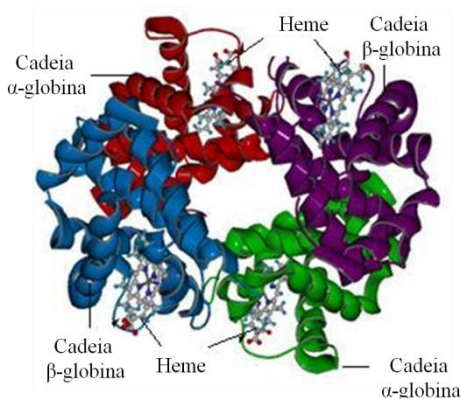


Figura I .1. Estrutura da hemoglobina
Adaptado de: www.commonswikipedia.org.

Cada tipo de cadeia globínica é codificado em cromossomas diferentes, sendo as cadeias do tipo α -globina codificadas por um conjunto de genes (agrupamento génico α -globina) localizados no cromossoma 16 (16p13.3) e as cadeias do tipo β -globina codificadas por um conjunto de genes (agrupamento génico β -globina) localizados no cromossoma 11 (11p15.5). Todos os genes são constituídos por três exões intercalados por dois intrões ou IVS (*Intervenig Sequence*)^[1].

I. 1 Os agrupamentos dos genes globínicos

I. 1. 1. Agrupamento génico α -globina

As diferentes cadeias tipo α -globina são codificadas pelos respectivos genes 5' - ζ - $\Psi\zeta$ - $\Psi\alpha_2$ - $\Psi\alpha_1$ - α_2 - α_1 - θ - 3', onde $\Psi\zeta$, $\Psi\alpha_2$ e $\Psi\alpha_1$ são pseudogenes. A expressão destes genes é sequencial ao longo do desenvolvimento do ser humano, segundo a ordem acima descrita. Durante a fase embrionária o gene ζ -globina está activo, passando a ser expressos os genes α -globina a partir do período fetal até à fase adulta. A expressão destes genes é regulada por uma região em *cis*, a montante deste agrupamento génico. Esta região genómica é constituída por quatro sequências conservadas (MCS- *Multispecies Conserved Sequences*), caracterizadas por serem hipersensíveis à acção da enzima DNase I, denominadas HS-48, HS-40, HS-33, HS-10 (Figura I. 2. A), de acordo com a distância a que se localizam em relação ao gene ζ -globina^[2]. Os genes α_2 - e α_1 -globina têm grande homologia na sua sequência nucleotídica (codificam cadeias polipeptídicas iguais). Este facto parece ser o resultado de um fenómeno

de duplicação durante a evolução seguida de conversão génica desde a região regulatória a 5' até ao intrão II. Estes dois genes estão integrados em regiões de homologia divididas em blocos. Devido à similaridade das sequências dos genes e das sequências que os flanqueiam, pode ocorrer o incorrecto alinhamento dos cromossomas aquando da divisão celular, o que, por recombinação, originará deleções ou duplicações destes genes [3].

I. 1. 2. Agrupamento génico β -globina

Este agrupamento génico é constituído por cinco genes, 5' - ϵ - $G\gamma$ - $A\gamma$ - $\Psi\beta$ - δ - β - 3' que, tal como no agrupamento génico α -globina, são expressos sequencialmente durante o desenvolvimento. A região regulatória, (LCR- Locus Control Region), encontra-se a cerca de 6 a 22kb a montante do gene ϵ -globina e é composta por cinco locais hipersensíveis à DNase I, apenas em células eritróides (HS-1, HS-2, HS-3, HS-4, HS-5) (Figura I. 2. B) [4].

O fenómeno de duplicação génica foi pela primeira vez descrito neste agrupamento génico, nomeadamente envolvendo os genes $G\gamma$ - e $A\gamma$ -globina. A duplicação de um fragmento de cerca de 5,5kb terá ocorrido há 47 milhões de anos [5]. Concretamente, um fragmento de 1,5kb do gene $G\gamma$ -globina é idêntico ao respectivo fragmento do gene $A\gamma$ -globina. Assim, a sequência de $G\gamma$ -globina terá convertido em sequências de $A\gamma$ -globina. A homologia entre os genes δ - e β -globina também terá origem em vários fenómenos de conversão génica não alélica, mas no entanto mais raros comparando com os genes γ -globina [3].

A ocorrência de *crossing-over* desigual neste agrupamento génico pode dar origem a duplicações e fusão de genes. A duplicação envolve geralmente genes com grande homologia, como sendo os genes γ -globina. Em 1981 foi descrito pela primeira vez a ocorrência da duplicação do gene $G\gamma$ -globina, dando origem a um alelo 5' - ϵ - $G\gamma$ - $G\gamma$ - $A\gamma$ - $\Psi\beta$ - δ - β - 3' [6]. No entanto, já foram descritos casos de triplicações, quadruplicações e quintuplicações destes genes. A fusão de genes resulta do mesmo processo, no qual o alinhamento incorrecto dos cromossomas origina genes híbridos cuja proteína daqui traduzida tem a porção N-terminal característica de uma cadeia globínica e a porção C-terminal de outra cadeia globínica. É o exemplo da Hb Lepore resultante da fusão dos genes δ - e β -globina e, ainda, o gene híbrido $G\gamma$ - $A\gamma$ -globina [7].

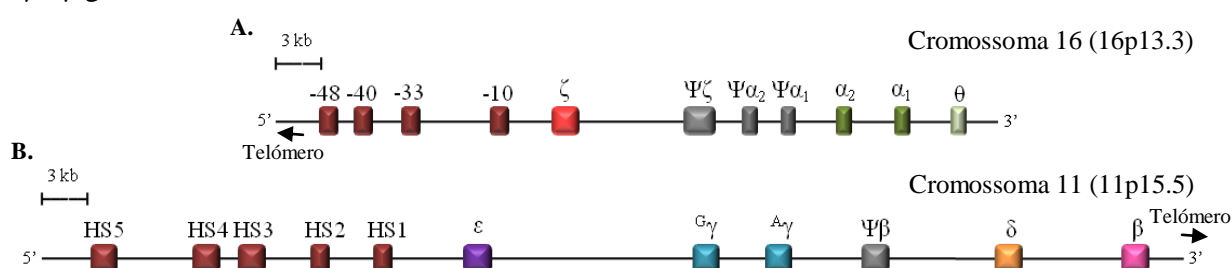


Figura I. 2. Esquema representativo dos agrupamentos génicos α -globina (A.) e β -globina (B.).

I. 2. Expressão diferencial dos genes globínicos ao longo do desenvolvimento

Durante o desenvolvimento a expressão das cadeias do tipo α - e β -globínicas é diferencial (Figura I. 3), dando origem a diferentes tipos de hemoglobinas nos vários estádios do desenvolvimento, segundo as cadeias que estão a ser expressas em cada agrupamento génico. Esta expressão diferencial depende da ocorrência de eventos comutativos (*switching*) pelos quais uns genes são silenciados e outros activados. Assim, durante a fase embrionária e em células eritróides nucleadas primitivas do saco vitelínico, o gene ζ -globina está activo, bem como o gene ε -globina e a associação destas cadeias originam a Hb Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$). O gene ζ -globina é então silenciado ainda nas primeiras etapas da gestação, passando a expressar-se o gene α -globina, cujas cadeias em associação com cadeias ε -globina, constituem a Hb Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$). A expressão do gene α -globina mantém-se durante o restante desenvolvimento e durante toda a fase adulta [9].

O primeiro evento de comutação ocorre entre os estádios embrionário e fetal. O gene ε -globina é silenciado, sendo por

sua vez os genes γ -globina activados, isto já em células hematopoiéticas no fígado fetal. Nesta fase predomina a hemoglobina fetal (Hb F) constituída por cadeias α - e γ -globina ($\alpha_2\gamma_2$). A proporção de cadeias $^G\gamma$ - e $^A\gamma$ -globina é geralmente de 70:30 no nascimento, e 40:60 em adulto. Após o nascimento a HbF, tem declínio gradual, até que na fase adulta apenas representa cerca de 1% do total de hemoglobina do sangue [10]. É também após o nascimento que se dá o segundo evento de comutação, com a activação do gene β -globina nas células eritróides da medula óssea. O gene δ -globina mantém a sua expressão a partir do nascimento. Concomitantemente, ocorre o silenciamento dos genes fetais γ -globínicos [11]. A expressão destes genes vai manter-se estável ao longo da vida adulta e as suas cadeias globínicas respectivas, vão associar-se com duas cadeias α -globina originando a HbA ($\alpha_2\beta_2$), que representa cerca de 96% da hemoglobina total de um adulto, e a HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) que é aproximadamente 3% do total de hemoglobina [1, 12].

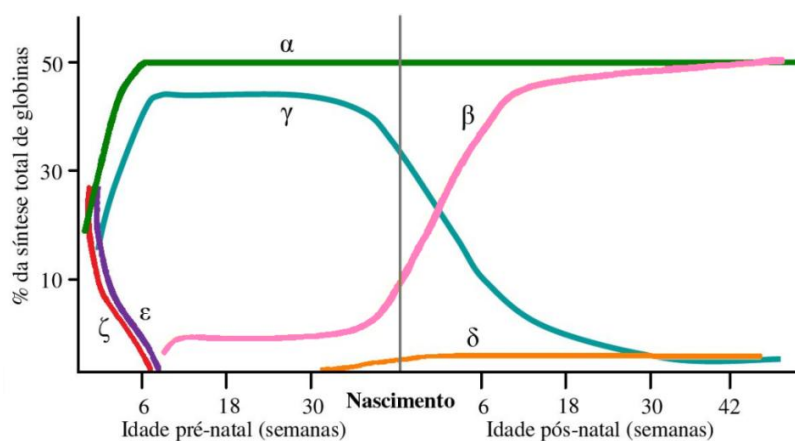


Figura I. 3. Síntese das diferentes cadeias globínicas ao longo da ontogenia humana (Adaptado de Weatherall and Clegg, 1981) [8].

I. 3. Regulação da expressão dos genes globínicos

Os genes globínicos são o exemplo melhor caracterizado de como os genes de mamíferos são regulados *in vivo*, e o seu estudo oferece uma ideia da ordem de eventos e dos mecanismos pelos quais os genes são activados ao longo da diferenciação e desenvolvimento^[13].

A expressão dos genes globínicos é mediada por sequências reguladoras proximais e distais, em relação às regiões codificantes de cada agrupamento génico. A activação e repressão dos genes globínicos individuais, específica do estadio de desenvolvimento, são reguladas por vários mecanismos. As sequências reguladoras proximais são elementos que recrutam e aos quais se ligam factores de transcrição, alguns específicos de tecido^[4].

I. 3. 1. Regulação da expressão dos genes globínicos do tipo β -globina

Dois modelos foram propostos para explicar a actuação da LCR na transcrição dos genes β -globínicos. O modelo *looping* defende a formação de um *loop*, permitindo a interacção directa da LCR com cada gene individualmente. A LCR, como holocomplexo, interage com os genes globínicos mediante a presença de factores *trans*-activadores de maneira a que apenas um gene seja activado. Esta interacção não é estática mas sim dinâmica, sendo que o mesmo holocomplexo interage com todos os genes globínicos. O modelo *linking* propõe a formação uma cadeia ao longo do *locus*, de factores específicos de cada estadio de desenvolvimento que facilitam a transcrição, definindo assim domínios permissivos a serem transcritos^[14].

Existem vários elementos *cis*- e *trans*-activadores envolvidos na regulação da expressão do gene β -globina. Estas proteínas podem actuar como factores de transcrição, moduladores da estrutura da cromatina e modificadores da conformação e localização nuclear do agrupamento β -globina. O factor específico de tecido eritróide, GATA-1, actua nas primeiras etapas da diferenciação das células eritróides e tem sido associado à acetilação de histonas da LCR e promotores dos genes β -globínicos, ao recrutamento da RNA Polimerase II para a LCR e promotores, e ainda favorecer a aproximação da LCR ao gene β -globina^[15, 16]. Ratinhos deficientes para o factor de transcrição eritróide EKLF (*Erytroid Kruppel Like Factor*) revelaram uma redução da expressão do gene β -globina. De facto, este factor recruta remodeladores da cromatina para o promotor do gene β -globina resultando na activação deste^[17, 18].

Outra proteína reguladora da expressão destes genes é a NF-E2, uma proteína de ligação a sequências activadoras que reconhece motivos MARE (*Maf-recognition elements*) na LCR,

no entanto, o estudo de Sawado e colaboradores em 2001 ^[19] determinou que a activação da transcrição do gene β -globina está associada ao recrutamento do *trans*-activador NF-E2 para o promotor deste gene, local onde não existem MAREs.

Noutro estudo, demonstraram que a mobilização dos nucleossomas, que são inibidores da transcrição, depende do recrutamento de remodeladores da cromatina do tipo SWI/SNF por parte da TATA box existente no promotor do gene ϵ -globina, o que permite a ligação da região HS2 da LCR activando a transcrição deste gene ^[20].

A análise de várias deleções naturais em indivíduos β -talassémicos demonstra a importância da LCR, para a regulação da expressão deste agrupamento génico ^[21, 22]. Em 2002, o estudo de Navas e colaboradores ^[23], em que ratinhos transgénicos sem a LCR não eram transcritos os genes β -globínicos, consolida esta constatação. Em 1996, Peterson e seus colegas ^[24] demonstraram que a LCR tem elementos funcionalmente redundantes, em ratinhos transgénicos com cromossomas artificiais de levedura portadores de deleções do HS3 e HS2. Já um estudo com ratinhos portadores da deleção do HS1 e HS4, concluiu que os HSs contribuem de forma aditiva para a actividade da LCR ^[25].

I. 3. 2. Regulação da expressão dos genes fetais (γ -globina)

Já foi vastamente demonstrado que a HbF tem efeito protector e atenuador dos sintomas clínicos em patologias onde há ausência ou diminuição do nível de HbA ou na drepanocitose, doença causada por uma variante de Hb altamente patogénica (HbS). O estudo da regulação dos genes fetais é deveras importante para a idealização de estratégias moleculares de indução da sua expressão, no período adulto. Estas estratégias têm como base a reactivação dos genes, reforçando a expressão de *trans*-activadores e/ou suprimindo a acção de repressores ^[26].

O estudo de Yan-Ni Ma e colaboradores em 2007 ^[27] identificou vários genes candidatos na regulação dos genes fetais. Genes altamente expressos no sangue do cordão umbilical e na medula óssea de doentes com elevada HbF, contribuiriam para a activação dos genes fetais, enquanto que genes pouco expressos estariam envolvidos no seu silenciamento. No ano seguinte, Sankaran e seus colegas ^[28] demonstraram a importância da expressão do gene repressor *BCL11A* (*B-Cell Lymphoma 11A*), na regulação da produção de HbF. Este é pouco expresso em células embrionárias e apenas começa a ser expresso em etapas mais avançadas do desenvolvimento, coincidindo com o silenciamento dos genes fetais. De facto, o *knockdown* deste gene resultou num aumento do γ mRNA três vezes superior ao β mRNA.

I. 4. Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias são patologias autossômicas recessivas associadas à síntese da proteína hemoglobina e constituem as doenças monogénicas mais comuns em todo o mundo. Estima-se que cerca de 7% da população mundial seja portadora destas anomalias genéticas [29]. As hemoglobinopatias podem ser classificadas como talassémias, quando há redução ou ausência da síntese das cadeias globínicas, ou como variantes de hemoglobina, quando é sintetizada uma cadeia globínica estruturalmente diferente [1, 12]. Nas talassémias, as deleções de genes ou parte deles, assim como de regiões de regulação e ainda algumas mutações pontuais nos genes globínicos, são as alterações moleculares mais comuns que estão na sua base.

As talassémias são por sua vez classificadas de acordo com a cadeia globínica que é ineficazmente sintetizada, isto é, α -, β -, $\delta\beta$ - e $\epsilon\gamma\delta\beta$ - talassémias. A reduzida ou ausente síntese de uma cadeia globínica vai induzir um desequilíbrio entre as cadeias globínicas dos dois agrupamentos génicos e, conseqüentemente, vai haver um excesso das cadeias que não tetramerizam, podendo estas precipitar na célula e causar danos nos precursores eritrocitários culminando numa eritropoiese ineficaz [12].

Uma variante de hemoglobina resulta de alterações na sequência que codificam para um aminoácido diferente. Estas mutações pontuais podem ser silenciosas, continuando a ser sintetizada uma proteína diferente mas funcional, ou então causar alterações estruturais graves que comprometem a funcionalidade da proteína, resultando em fenótipo talassémico. Existem já descritas mais de 1000 variantes de hemoglobina (<http://globin.cse.psu.edu/>).

I. 4. 1. α -talassémias

As α -talassémias são doenças associadas maioritariamente a deleções dos genes α -globínicos, uma vez que é recorrente o mau emparelhamento dos cromossomas com conseqüente *crossing-over* desigual. As deleções mais comuns que ocorrem neste agrupamento são a $-\alpha^{3,7kb}$ e $-\alpha^{4,2kb}$, ambas originando alelos com apenas um gene α -globina. As α^+ -talassémias correspondem a três genes α -globina activos, enquanto que nas α^0 -talassémias apenas dois dos quatro genes são expressos. A doença da HbH caracteriza-se pela ausência de expressão de três genes α -globina e, conseqüentemente, o excesso de cadeias β -globina tetrameriza formando a HbH (β_4) que precipita nas células. Quando os quatro genes estão deleccionados ocorre morte fetal- *Síndrome Hydrops fetalis* [30]. Os doentes portadores de α -talassémia apresentam anemia hipocrómica microcítica de gravidade variável, dependendo do número de cópias de genes α -globina activos.

I. 4. 2. β -talassémias

Cerca de 1,5% da população mundial é portador de β -talassémia e devido ao seu efeito protector contra a malária, esta doença tem uma distribuição semelhante a regiões como África, Mediterrâneo, Sudeste Asiático e Médio Oriente, onde a malária é, ou foi prevalente [31]. Em Portugal as regiões do centro e sul do país têm maior predomínio, registando-se frequências superiores a 2% em alguns distritos [32].

Ao contrário do que acontece no agrupamento génico α -globina, as β -talassémias são geralmente consequência de mutações pontuais, mas no entanto também podem ocorrer deleções. As β -talassémias podem ser divididas em duas categorias, β^0 -talassémia e β^+ -talassémia. O primeiro caso verifica-se quando o gene anormal não é expresso ou está deleccionado, não havendo portanto síntese da cadeia β -globina. Nas β^+ -talassémias a síntese da cadeia globínica é reduzida e estão em causa geralmente mutações pontuais [12]. As mutações β -talassémicas mais comuns encontradas na população portuguesa são a β Cd39 (C>T), β IVS-I-1 (G>A), β IVS-I-6 (T>C) e β IVS-I-110 (G>A) [33].

As β -talassémias podem também ser classificadas segundo o fenótipo clínico dos doentes. Uma β -talassémia *minor*, ou traço talassémico, é caracterizada por um fenótipo clínico geralmente assintomático no entanto com fenótipo hematológico típico, isto é, microcitose, hipocromia e elevado nível de HbA₂. Estes doentes são normalmente portadores de mutações em heterozigotia. Na β -talassémia *major*, os doentes são homozigóticos ou heterozigóticos compostos para mutações β -talassémicas e necessitam de transfusões sanguíneas regularmente desde os primeiros anos de vida, pois apresentam uma anemia muito grave. Doentes com fenótipo clínico intermédio aos descritos anteriormente, dizem-se ter β -talassémia intermédia podendo necessitar, ocasionalmente, de transfusões sanguíneas. As alterações moleculares são variadas, desde homozigotias ou heterozigotias compostas para mutações suaves [12].

A gravidade da doença está directamente relacionada com o grau de desequilíbrio entre os dois tipos de cadeias globínicas, isto é, com o excesso de cadeias α -globínicas. Estas vão acumular-se nos precursores eritrocitários, precipitar e formar corpos de inclusão que vão provocar danos mecânicos e destruição celular prematura na medula óssea. A anemia típica resulta então da combinação de uma eritropoiese ineficaz, hemólise periférica e ainda da redução de hemoglobina total [34].

I. 4. 2. 1. Diagnóstico laboratorial

No diagnóstico de talassémias, são doseados vários parâmetros hematológicos: a concentração de hemoglobina total, o número de glóbulos vermelhos (GV), o volume globular médio (VGM), a hemoglobina globular média (HGM) e ainda a percentagem de HbA₂ e HbF. A Tabela I. 1. apresenta valores normais destes parâmetros em indivíduos adultos. A observação ao microscópio de lâminas com esfregaços sanguíneos, permite ainda a observação de alterações morfológicas das células como a microcitose e hipocromia, incluindo alterações na forma das células, como por exemplo no caso da drepanocitose (células falciformes). As metodologias utilizadas variam entre electroforese, focagem isoeléctrica (IF) e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), para a quantificação de HbA₂ e HbF, e também para identificação de variantes estruturais de hemoglobinas [35]. Após a determinação dos parâmetros hematológicos é possível caracterizar o genótipo associado ao fenótipo recorrendo a metodologias de biologia molecular como a reacção em cadeia da polimerase (PCR), a sua variante *gap*-PCR, ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*), restrição enzimática, sequenciação, MLPA etc.

Tabela I. 1. Valores hematológicos de referência para indivíduos adultos normais e para portadores de β -talassémia [36, 37]

	Hb (g/dL)	GV (10 ¹² cél/L)	VGM (fL)	HGM (pg)	HbA ₂ (%)	HbF (%)
Normais	Homem	15 ± 2,0	5,0 ± 0,5	92 ± 9	29,5 ± 2,5	1,5 – 3,5
	Mulher	13,5 ± 1,5	4,3 ± 0,5			
Portadores de β -talassémia	Nível normal ou diminuído	Geralmente aumentado	< 80 (Microcitose)	< 27 (Hipocromia)	>3,5	1 a 3

I. 4. 3. δ - e $\delta\beta$ -talassémias

Existem também mutações δ^0 - e δ^+ -talassémicas que suprimem ou reduzem, respectivamente, a produção de cadeias δ -globina. Os defeitos na síntese da HbA₂ não são clinicamente relevantes, mas no entanto podem levar a um diagnóstico erróneo de portadores de β -talassémia, uma vez que baixa o valor de HbA₂, que tipicamente deveria estar aumentado, para valores normais. As alterações podem ser deleções, mutações pontuais ou mutações que alteram a grelha de leitura [12, 38]. A alteração pontual mais prevalente na região do Mediterrâneo é G>T, no codão 27, dando origem à variante HbA₂ Yialousa [39].

Nas $\delta\beta$ -talassémias, os genes δ - e β -globina podem estar deleccionados deixando intactos os genes γ -globina, ou então o alelo com o gene δ -globina deleccionado possui ainda uma mutação pontual no gene β -globina [12]. É o caso da deleção Corfu descrita em 1985 por

Wainscoat e colaboradores ^[40]. Esta deleção remove parte do gene δ -globina e o mesmo alelo transporta ainda a mutação no nucleótido 5 da IVS-II, sendo portanto uma $\delta^0\beta^+$ -talassemia. No entanto já foram descritos casos nos quais a mutação no gene β -globina não está presente ^[41].

I. 4. 4. $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talassémias

Este tipo de talassémia é consequência da deleção total do agrupamento génico β -globina ou da LCR. Apenas se encontram doentes heterozigóticos, uma vez que o estado homozigótico é incompatível com a vida fetal. Embora raras, já foram descritas várias deleções em que os seus portadores apresentam anemia hipocrómica microcítica com HbA₂ e HbF elevada, mas com um gene β -globina intacto ^[42, 43, 44].

I. 4. 5. Persistência hereditária da hemoglobina fetal - HPFH (Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin)

A HbF encontra-se apenas em algumas células eritrocitárias, as células F, e atinge o seu valor máximo durante a vida fetal representando uma percentagem mínima no adulto (<1%). No entanto, há casos de adultos normais em que a HbF está presente em percentagens elevadas. Esta anomalia é hereditária e tem a designação de persistência hereditária da hemoglobina fetal, em que a produção da HbF mantém-se elevada ao longo da vida adulta. São várias as alterações genéticas que estão na sua base, podendo ser divididas em dois tipos:

I. 4. 5. 1. HPFH deleccional

Estão descritas várias deleções no agrupamento génico β -globina que apesar de alguns genes estarem ausentes, apenas se verifica um aumento da percentagem da HbF mantendo-se os restantes parâmetros hematológicos normais ^[45]. Estas deleções aproximam sequências reguladoras em *cis*, que normalmente estariam distantes dos genes γ -globina, exacerbando a sua expressão ^[46].

I. 4. 5. 2. HPFH não deleccional

A HPFH pode também ter origem em mutações pontuais nos promotores dos genes fetais. São locais reconhecidos por elementos reguladores que, quando mutados, afectam a ligação de factores que actuam em *trans* e factores eritróides-específicos ^[47]. São exemplos mutações nas posições -202, -175, -161 e -158 do promotor do gene ^G γ -globina e -202, -198, -195, -175 e -117 do promotor do gene ^A γ -globina. A mutação C>T na posição -158 do promotor ^G γ -globina, representa o maior factor molecular determinante na produção de HbF ^[48, 49].

I. 4. 6. Modificadores genéticos dos fenótipos talassémicos

A co-herança de um alelo α^0 - ou α^+ -talassémico pode normalizar os parâmetros hematológicos de um portador β -talassémico, pois deixa de haver excesso de cadeias α -globina e assim, o desequilíbrio de cadeias de ambos os agrupamentos é anulado. No entanto o valor de HbA₂ mantém-se elevado, daí a importância da determinação desta para o diagnóstico de β -talassémia. A presença de uma mutação no gene δ -globina que reduza ou anule a sua expressão, irá baixar para valores normais a elevada percentagem de HbA₂ típica de portadores β -talassémicos. Deste modo o diagnóstico de uma β -talassémia pode não ser esclarecido [50].

Pelo contrário, os parâmetros hematológicos podem ser agravados quando é herdado um alelo α -globina com triplicação ou quadruplicação destes genes, exacerbando o desequilíbrio entre as cadeias globínicas [51]. No que diz respeito à produção de HbF, factor que pode amenizar o fenótipo talassémico, são vários os determinantes que influenciam a expressão dos genes fetais. Dentro do agrupamento génico β -globina, o determinante com maior influência na produção de HbF é o polimorfismo a -158 do gene γ -globina. Este é responsável por cerca de 13-32% da variação total de HbF [52]. O estudo de Mastropietro e Modiano em 2002 [53], demonstrou que a severidade dos sintomas clínicos correlacionam-se negativamente com o aumento de HbF, sendo que em doentes com β -talassémia *major*, a frequência da mutação C>T na posição -158 de γ -globina é mais baixa do que a encontrada em doentes com β -talassémia intermédia. Apesar do polimorfismo a -158 de γ -globina ser um factor modelador, existem casos de doentes β -talassémicos com o genótipo C/C (-/-) que apresentam igualmente elevada percentagem de HbF. Isto leva a crer que outros factores que actuam em *trans*, têm também influência na produção de HbF, os designados *Quantitative Trait Locus* (QTLs). Os QTLs mais relevantes até agora descobertos localizam-se no cromossoma 6q23 [55], no cromossoma 8q [56], no cromossoma Xp22.2 [57] e no cromossoma 11 [58].

II. OBJECTIVOS

Com este estudo pretendeu-se efectuar a:

- Implementação, no laboratório de biologia molecular de hemoglobinopatias, da metodologia de MLPA para a pesquisa de grandes deleções no agrupamento génico β -globina;
- Construção de sondas MLPA sintéticas recorrendo a diversos softwares informáticos com a finalidade de caracterizar o mais finamente possível os pontos de quebra de novas deleções;
- Caracterização molecular de casos talassémicos atípicos ou raros cuja base molecular escapa a técnicas utilizadas diariamente em laboratórios de diagnóstico;
- Determinação da causa molecular para valores elevados de HbF em indivíduos adultos normais e β -talassémicos.

Com o cumprimento destes objectivos será possível esclarecer casos clínicos individuais e familiares, quer com o intuito da investigação científica com contribuição para o aumento do conhecimento científico, mas também em certos casos, poder informar os envolvidos, por pessoas habilitadas em consultas de acompanhamento genético, da probabilidade do risco de descendência com a patologia em causa.

III. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Para a realização deste trabalho de investigação foram seleccionados, de acordo com o fenótipo hematológico, um conjunto de indivíduos provenientes da Unidade de Referência do Centro de Promoção de Saúde e Doenças Crónicas do INSA, e da Unidade de Genética Molecular do Departamento de Genética do INSA, cuja causa molecular para a sua patologia não foi detectada pelas técnicas aqui utilizadas. Os seus parâmetros hematológicos foram determinados no contador de células automático Beckman Coulter LH 750, e a razão $G\gamma:A\gamma$ por HPLC em fase reversa com o aparelho Agilent 1100 Serie Liquid Chromatograph.

III. 1. Extracção e quantificação de DNA

A extracção do DNA de cada indivíduo estudado foi feita a partir de 500 μ L da amostra de sangue periférico colhido em EDTA, pelo método de extracção automática de DNA no aparelho MagnaPure LC, Roche[®]. Para a sua quantificação e determinação da pureza, determinou-se a razão entre as absorvâncias dos comprimentos de onda a 260 e 280nm (A260/280) e a razão entre as absorvâncias dos comprimentos de onda a 230 e 280nm (A230/280) num espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf).

III. 2. PCR (*Polymerase Chain Reaction*), *gap*-PCR e *long*-PCR

A reacção em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de utilização corrente em qualquer laboratório de biologia molecular, que permite a amplificação de uma sequência específica de DNA *in vitro*. Neste trabalho esta metodologia foi utilizada para a amplificação de genes e promotores de genes (Anexo A).

O *gap*-PCR é uma metodologia variante do PCR utilizada para determinar os pontos de quebra de deleções conhecidas ou não, através da utilização de oligonucleótidos iniciadores que se localizam externamente e o mais próximo possível, dos pontos de quebra da deleção. No caso de deleções conhecidas é também incluído um oligonucleótido iniciador que híbrida, no alelo normal, na região correspondente à sequência delectada, amplificando assim um fragmento controlo normal. Para grandes deleções desconhecidas procede-se a um *long*-PCR, que permite amplificar fragmentos de grande tamanho. O *kit* Expand Long Template (Roche[®]) permite amplificar fragmentos com tamanhos superiores a 12kb (Anexo A).

O resultado destas metodologias é visualizado após electroforese dos produtos de PCR num gel de agarose com concentração dependente do tamanho dos fragmentos amplificados e suplementado com brometo de etídeo (10mg/mL, Sigma[®]) numa concentração de 1 μ L por

cada 12,5mL de solução. A visualização do resultado é feita através de um dispositivo de emissão de raios-ultravioleta (UV) (EagleEye™II, Statagene®). Quando necessário, oligonucleótidos iniciadores foram construídos recorrendo ao *software* disponível na internet Oligo Analyser (<http://www.idtdna.com/analyser/Applications/OligoAnalyser>).

III. 3. Purificação dos produtos de PCR e *gap*-PCR

Quando necessário, geralmente para sequenciação, a purificação dos produtos das reacções de PCR e *gap*-PCR foi obtida através do *kit* comercial NucleoSpin® Extract II PCR clean-up and Gel extraction e por vezes recorrendo à solução ExoSAP-IT®.

III. 4. Sequenciação automática

A técnica de sequenciação utilizada neste estudo baseia-se no método de Sanger com o recurso ao *kit* comercial BigDye® Terminator V 1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante, e ao dispositivo 3130X Genetic Analyser, Abi Prism (Applied Biosystems).

III. 5. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphims)

Para a definição dos haplótipos associados ao agrupamento génico β -globina de cada indivíduo deste estudo, determinaram-se os polimorfismos dos oito locais polimórficos deste agrupamento. Para cada local polimórfico uma reacção de PCR, com oligonucleótidos iniciadores específicos, permite a amplificação da sequência genómica pretendida, seguida de digestão enzimática com endonucleases de restrição (*Hinc* II, *Xmn* I, *Hind* III, *Ava* II e *Hinf* I) a 37°C durante pelo menos 4 horas (Anexo B). Os produtos obtidos são visualizados após electroforese num gel de agarose com radiação UV.

III. 6. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

Esta metodologia relativamente recente foi descrita por *Schouten* e colaboradores ^[59], e tem aplicabilidade na detecção de alterações moleculares ao nível do DNA como sendo diferentes números de cópias de uma dada sequência genómica. Esta técnica baseia-se na hibridação de sondas que são constituídas por um par de oligonucleótidos complementares da sequência em estudo, e que vão ser amplificadas ao longo da reacção por meio de oligonucleótidos iniciadores comuns ao conjunto das sondas. Os fragmentos amplificados têm tamanhos únicos e deste modo por electroforese capilar é possível separar esses mesmos fragmentos (Anexo B). A sua detecção é possível graças à marcação com FAM existente na região 5' da sonda MLPA.

III. 6. 1. Procedimento experimental

Em cada tubo de reacção são utilizados 5µL de DNA genómico (a 20ng/µL) que é primeiramente desnaturado durante 5 minutos (min) a 98°C. Após atingida a temperatura ambiente é adicionada a mistura das sondas e tampão de hibridação, 1,5µL de cada, seguida de uma desnaturação adicional a 95°C durante 1min. A reacção de hibridação, na qual as sondas de MLPA vão hibridar com a sequência complementar no DNA genómico, tem a duração de no mínimo 16 horas a 60°C. Segue-se a reacção de ligação dos oligonucleótidos iniciadores a 54°C com a adição da mistura dos tampões A e B da enzima Ligase-65 (3,0 µL cada), 25µL de água estéril bidestilada e 1,0µL da enzima Ligase-65. Após 15min a temperatura sobe aos 98°C durante 5min e a enzima é inactivada. Atingidos os 4°C é adicionado a 10µL da reacção de ligação, num novo tubo de reacção, 26,0µL de água estéril bidestilada e 4,0µL de tampão de PCR. A temperatura é elevada a 60°C e finalmente adiciona-se 2,0µL de oligonucleótidos iniciadores, 2,0µL de tampão de diluição da enzima, 5,5µL de água estéril bidestilada e 0,5µL da enzima polimerase tendo assim início a reacção de PCR. Esta decorre ao longo de 33 ciclos correspondendo cada um a 30 segundos (s) a 95°C, 30s a 60°C e 60s a 72°C, seguida de extensão final a 72°C durante 20min. O volume final da reacção é de 50µL. Segue-se a separação dos fragmentos amplificados por electroforese capilar no dispositivo de sequenciação automática adicionando a cada tubo de reacção o marcador Gene Scan™ ROX™ Size Standard (Applied Biosystems). Os valores obtidos são tratados numa folha de cálculo do EXCEL. Neste trabalho foi utilizado o *kit* SALSA MLPA kit P102-B1 HBB (MRC- Holland, Amsterdam).

III. 6. 2. Análise dos resultados

Na folha de cálculo efectuou-se a média dos valores das áreas dos picos correspondentes a cada sonda, pois as amostras foram testadas em duplicado. Seguiu-se a normalização interna e externa dos dados. Para a normalização interna os valores dos picos das sondas do agrupamento foram comparados com os valores dos picos de 14 sondas que hibridam fora do agrupamento génico β-globina. Para normalização externa foram utilizados em cada ensaio três controlos normais testados anteriormente. Se a sequência reconhecida pela sonda está presente em ambos os alelos, a razão entre a amplificação da sonda respectiva na amostra e a média dos três controlos será próxima da unidade. Se apenas uma cópia da sequência está presente, então é de esperar que esta razão diminua cerca de 35 a 50%, sendo que uma diminuição de cerca de 100% corresponderá à ausência da sequência em homozigotia. No caso de duplicações ou maior número de cópias, a razão será aumentada na mesma proporção.

III. 6. 3. Construção de sondas MLPA sintéticas

Esta metodologia permite personalizar a análise das amostras pela síntese química de sondas que não estão incluídas no *kit* comercial e que hibridem em locais escolhidos deliberadamente pelo seu utilizador. Deste modo é possível obter um resultado com maior precisão, em caso por exemplo de deleção, resultando numa maior aproximação dos pontos de quebra. No site <http://www.mlpa.com> encontra-se disponível o procedimento para o desenho das sondas MLPA sintéticas. As sondas sintéticas são obtidas apenas por síntese química ao passo que nas comerciais, um dos oligonucleótidos é obtido por síntese química e o outro por meio de clonagens em vectores derivados do vector M13. Isto com a finalidade de obter uma sequência intermédia que possibilita a separação das sondas amplificadas dependendo do seu tamanho. Como esta sequência não está presente nos oligonucleótidos sintéticos, estes são de tamanho inferior, e toda a sua extensão híbrida com a sequência alvo. No entanto, estas sondas têm propensão para resultados menos satisfatórios, e como a relação tamanho/qualidade é negativa, as sondas sintéticas devem ter tamanhos semelhantes (diferença de quatro nucleótidos). No mínimo, as sequências que hibridam com a região alvo, têm 21nt de extensão, mas se o objectivo do estudo molecular é detectar polimorfismos, quanto maior for o tamanho, menor é a sensibilidade à instabilidade deste tipo de alteração.

As sondas sintéticas devem ser construídas de maneira a que hibridem em regiões únicas codificantes, com percentagem de G+C de cerca de 50% e que sejam totalmente específicas desta mesma região. O seu primeiro nucleótido logo depois do oligonucleótido iniciador directo, como afecta o sinal da sonda, deve, para sondas pequenas, oferecer um sinal mais forte, e para sondas maiores um sinal mais fraco (força do sinal descendente: C > G > T > A). As sondas, com os oligonucleótidos iniciadores incluídos, devem ter um tamanho compreendido entre 96bp e 132bp, e a mistura de sondas sintéticas não deve exceder o número 10. Os restantes reagentes necessários à reacção de MLPA são fornecidos nos *kits* SALSA MLPA REAGENTS EK (MRC- Holland, Amsterdam).

Para a construção das sondas sintéticas utilizadas neste trabalho foi necessário recorrer a diversos *softwares* informáticos, nomeadamente <http://projects.tcag.ca/variation/> para assegurar a especificidade da sonda, isto é, que seja totalmente complementar com uma sequência única da região genómica que se quer detectar, e ainda para assegurar as condições óptimas de hibridação imposta pelo protocolo (<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/dna-form1.cgi>).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram seleccionados 20 indivíduos com fenótipo hematológico de talassémia atípico, e quando necessário, ou possível, foi realizado o estudo familiar para facilitar a interpretação dos resultados e a associação genótipo/fenótipo. De acordo com o fenótipo que apresentavam, foram escolhidas as técnicas mais adequadas para caracterizar rapidamente e eficientemente a causa molecular para o fenótipo hematológico. Para a implementação da metodologia de MLPA na resolução de alguns casos, foi primeiramente executado um estudo em indivíduos com fenótipo hematológico normal, com o intuito de avaliar a fiabilidade desta nova metodologia aplicada ao estudo deste agrupamento génico, e ainda um estudo em indivíduos com fenótipo talassémico e genótipo conhecido de algumas deleções, com a finalidade de comprovar a capacidade da metodologia de detectar deleções. Os resultados foram satisfatórios para ambos os estudos (Anexo C). Daqui foram escolhidos três DNAs de indivíduos normais para constituírem os controlos, incluídos em cada ensaio de MLPA para posterior normalização dos dados. Do conjunto de indivíduos estudados foram constituídos três grandes grupos de acordo com a semelhança do fenótipo hematológico apresentado. Apesar de não apresentarem fenótipo hematológico patológico, os indivíduos aparentados foram incluídos na mesma tabela que os indivíduos seleccionados para o estudo.

IV. 1. Indivíduos talassémicos com HbA₂ normal ou diminuída

Tabela IV. 1. Perfil hematológico de indivíduos com alterações moleculares nos genes δ - e/ou β -globina

Ind. N°	Idade-Género*	GV (10 ¹² cél./L)	Hb (g/dL)	VGM (fL)	HGM (pg)	HbA ₂ (%)	HbF (%)	Xmn I	Alteração molecular ^Φ
1	Adulto-F	5,18	10,3	63,5	19,9	2,3	nd	+/-	HBB:c.118C>T/N HBD:c.82G>T/N
2	32-F	5,90	11,1	58,7	18,8	3,1	2,3	+/-	HBB:c.92+1G>A/N HBD:c.82G>T/N
2a	66-F	5,80	10,7	58,1	18,5	4,2	1,4	+/-	HBB:c.92+1G>A/N
3	39-F	4,30	13,0	89,9	30,2	1,2	1,9	+/-	NG_000007.3:g.57237_64443del7207/N

*F- Feminino; M- Masculino; idade expressa em anos; 2a- Mãe do indivíduo n°2; Φ Nomenclatura HGVS; nd- não determinado

Os três primeiros indivíduos deste grupo são portadores heterozigóticos de mutações β^0 -talassémicas (tal.) (respectivamente, HBB:c.118C>T/N e HBB:c.92+1G>A/N), detectadas em estudos anteriores. O valor atípicamente normal da HbA₂ nos portadores β -talassémicos n°1 e 2, fundamentou a execução da amplificação seguida de sequenciação do gene δ -globina, a

qual revelou a mutação G>T no codão 27 (HBD:c.82G>T) (Figura IV. 1.). Esta mutação, para além de significar a tradução de uma proteína com um aminoácido diferente (Serina em vez de Alanina), também impede o correcto processamento do mRNA, nomeadamente o processo de *splicing*, reduzindo a quantidade de proteína produzida. A mutação δ^+ -tal. origina uma hemoglobina variante que foi descrita pela primeira vez numa família grega, e foi denominada como HbA₂ Yialousa [60]. O efeito de redução da percentagem total de HbA₂ é evidente quando se comparam os indivíduos com grau de parentesco (nº2 e 2a), em que a mãe apenas apresenta a mutação β^0 -tal., e a filha, para além desta, também é portadora da mutação δ^+ -tal. (respectivamente HbA₂= 4,2 e 3,1%). Nesta família, a filha terá recebido a mutação β -talassémica da mãe, e a mutação no gene δ -globina do pai (DNA não disponível para estudo). Estes dois casos (nº1 e 2) são um exemplo do risco existente de diagnóstico erróneo de β -talassémia. O efeito da mutação no gene δ -globina altera o fenótipo típico de β -talassémicos, nomeadamente a percentagem elevada de HbA₂, podendo ser confundido por exemplo com uma α -talassémia. Torna-se assim importante averiguar a causa verdadeira da patologia para informar os indivíduos do risco de descendência gravemente doente, no caso de o companheiro/a ser portador de uma mutação no gene β -globina.

No estudo realizado por Lacerra e colaboradores [38], foram determinados os haplótipos associados à variante Hb Yialousa. Verificaram, numa população Mediterrânea, a associação a dois haplótipos 5' (*Hind*III ^G γ , *Hind*III ^A γ , *Hinc*II $\Psi\beta 5'$ e *Hinc*II $\Psi\beta 3'$), o haplótipo “+ - + +” e o haplótipo “- - - +” numa proporção de 56:2. Nos casos acima (nº1 e 2), a determinação dos haplótipos permite concluir que o indivíduo nº1 é provavelmente portador do haplótipo “+ - + +” pois apresenta os polimorfismos “+/-, +/-, +/+, +/+” nos respectivos locais, e o indivíduo nº2 mais provavelmente do haplótipo “+ - + +”, mas também é possível que seja portador do haplótipo “- - - +”, já que ele apresenta os polimorfismos “+/-, -/-, +/-, +/-”. Não parece portanto, ter ocorrido novos rearranjos neste alelo.

O indivíduo nº3 da Tabela IV. 1. apresentava apenas uma baixa percentagem de HbA₂ em relação ao normal. Deste modo, e como a sequenciação do gene δ -globina nada detectou, aplicou-se a técnica de MLPA, na qual se verificou um abaixamento de cerca de 50% da razão das sondas nº16 e 17 (Figura IV. 1. A) que hibridam respectivamente na região a montante e no exão 1 do gene δ -globina. Este perfil de MLPA é compatível com o perfil de MLPA para a

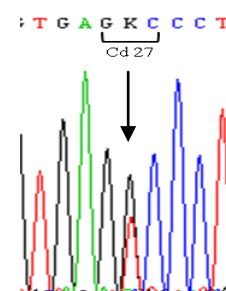


Figura IV. 1. Sequenciação da região 5' do gene δ -globina. Hb Yialousa, variante da cadeia δ -globina detectada nos indivíduos nº 1 e 2, onde ocorre a transversão G>T, em heterozigotia, no cd 27.

delecção Corfu ^[40], já descrita (NG_000007.3:g.57237_64443del7207). Sendo assim, foi realizado um *gap*-PCR específico que confirmou a presença desta delecção em heterozigotia (Figura IV. 2. B). Esta remove cerca de 7,2kb desde a região intergénica $\Psi\beta - \delta$ até à IVS-II do gene δ -globina (Figura IV. 10). Assim, a mutação caracteriza-se por ser δ^0 -tal, já que não é produzida esta cadeia globínica, o que explica por sua vez o abaixamento da percentagem total de HbA₂. Foi descrita associado a esta delecção um aumento da percentagem de HbF, uma vez que a delecção remove uma região à qual se liga o repressor BCL11A ^[28]. No entanto, este aumento da HbF não se verifica neste caso. O facto de o repressor não se ligar a esta região, não significa que a HbF sofra um aumento, outros factores podem estar a actuar neste sentido no caso do estudo anterior. Também foi descrita, em associação com a delecção, a alteração no nucleótido 5 da IVS-II do gene β -globina ^[61]. Contudo a sequenciação deste gene no indivíduo n^o3, nada detectou. Com este novo rearranjo, perdeu-se a associação com a mutação no gene β -globina. Para o indivíduo n^o3, a mutação não representa qualquer patologia, uma vez que a HbA₂ apenas representa uma pequena percentagem da Hb total. No entanto, os seus descendentes podem receber o alelo mutado, e se herdarem também uma mutação no gene β -globina, estamos perante um caso semelhante ao do indivíduo n^o2.

IV. 2. Indivíduos talassémicos com HbF elevada (HPFH)

IV. 2. 1. E com HbA₂ elevada

Este grupo é constituído por indivíduos β -talassémicos típicos mas com percentagens de HbF acima do esperado, e alguns com a razão $G\gamma:A\gamma$ desviada para $G\gamma$ -globina (Tabela IV. 2).

O indivíduo n^o4 é portador, em heterozigotia, da mutação β^0 -tal. (G>A), no nucleótido 1 do

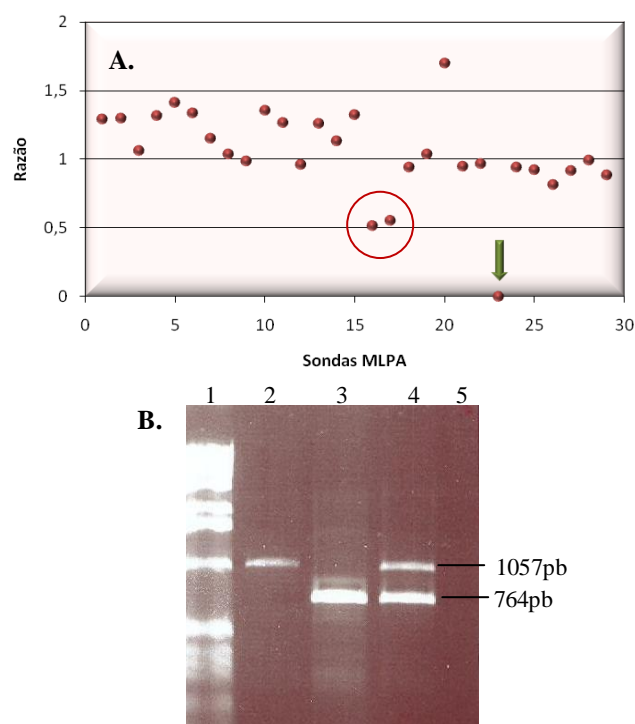


Figura IV. 2. A. Perfil de amplificação das sondas MLPA do indivíduo n^o3. Delecção em heterozigotia da região correspondente à hibridação das sondas n^o 16 e 17 []. A sonda n^o23 [↓] só amplifica na presença da mutação drepanocítica. B. Imagem do gel de agarose correspondente ao *gap*-PCR. O segundo poço contém amostra de DNA de um indivíduo normal, o terceiro poço de um indivíduo homozigótico para a delecção, o quarto poço diz respeito ao indivíduo estudado e o último poço corresponde ao controlo negativo (sem DNA).

IVS-I do gene β -globina (HBB:c.92+1G>A), que justifica os valores baixos de VGM e HGM, e HbA₂ elevada. Dada a razão $G\gamma:A\gamma$ claramente desviada para $G\gamma$ -globina (96:4), procedeu-se à sequenciação dos promotores dos genes fetais, que revelou a mutação C>T na posição -158 de $A\gamma$ -globina, designada HPFH Cretan (HBG1:c.-211C>T) (Figura IV. 3. A). No entanto, esta mutação está descrita como resultando numa razão de 60:40 e numa percentagem de HbF menos elevada [62].

Submeteu-se então a amostra a um ensaio de MLPA, que detectou um aumento da razão das sondas nº12 e 13 (Figura IV. 3. B) que corresponde a uma duplicação do gene $G\gamma$ -globina. Juntando o facto de o

indivíduo ser ainda portador do alelo T na posição -158 de $G\gamma$ -globina, fica explicado o grande aumento da percentagem de HbF e o desvio da razão $G\gamma:A\gamma$ para $G\gamma$ -globina.

O indivíduo nº5 também revelou ser portador de HPFH Cretan e ainda de um alelo T na posição -158 de $G\gamma$ -globina. Estas duas anomalias podem explicar a percentagem de HbF e o desvio da razão $G\gamma:A\gamma$ para $G\gamma$ -globina. Comparando com o caso acima, a percentagem de HbF é inferior pois não apresenta duplicação de $G\gamma$ -globina. A deleção $-\alpha^{3,7kb}$ (NG_000006.1:g34164_37967del3804), anteriormente detectada, é a causa dos valores baixos de VGM e HGM. Não obstante, este indivíduo também é portador da mutação drepanocítica (HBB:c.20A>T) em heterozigotia. No indivíduo nº6, a mutação β IVS-I-1 (G>A) explica os valores de VGM e HGM, mas em relação à elevada percentagem de HbF, apenas se encontrou, como causa possível, a presença em homozigotia do alelo T no polimorfismo a -158 de $G\gamma$ -globina.

Nos casos em que a razão $G\gamma:A\gamma$ não mostrava desvio evidente, aplicou-se a metodologia de MLPA para detectar possíveis grandes deleções. De facto, os indivíduos nº7 e 8, Cabo Verdianos, são portadores de uma deleção em heterozigotia, revelado pelo abaixamento para 0,5 da razão das sondas nº 26, 27 e 28 (Figura IV. 4. A e B). Esta apresenta um tamanho mínimo de 3kb e máximo de 10,5kb, removendo o terceiro exão do gene β -globina.

O ponto de quebra a 5' encontra-se numa região de incerteza de 906bp, compreendida entre

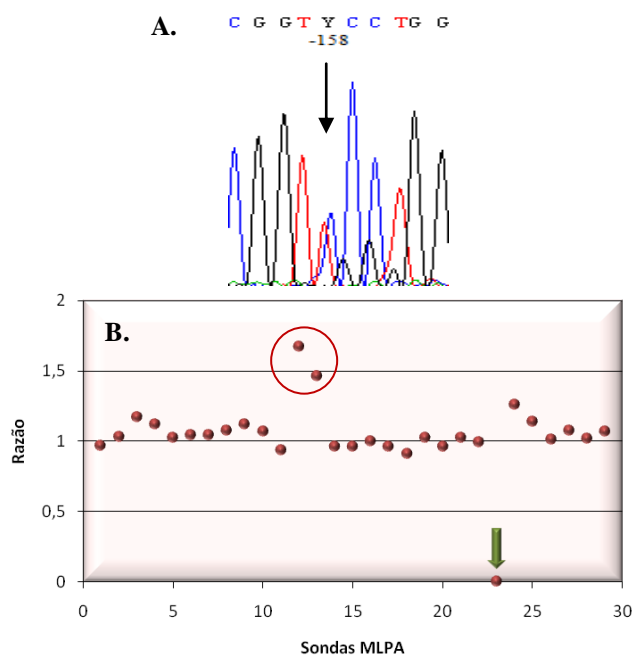


Figura IV. 3. A. Sequenciação do promotor do gene γ -globina. HPFH Cretan, mutação C>T, em heterozigotia, na posição -158 detectada nos indivíduos nº4 e 5. **B.** Perfil de amplificação das sondas MLPA do indivíduo nº4. As sondas 12 e 13 [○] apresentam uma razão correspondente a uma duplicação. A sonda nº23 [↓] só amplifica na presença da mutação drepanocítica.

a IVS-II nt122 (sonda nº25) e o nucleótido 48 da região 3'UTR (sonda nº26) do gene β -globina. Numa tentativa de melhorar o mapeamento do ponto de quebra 3' desta deleção foram desenhados vários oligonucleótidos iniciadores para serem usados em *long*-PCR (Anexo A), no entanto, devido à presença de sequências repetitivas a 3' do gene β -globina (sequências L1), apenas um obteve resultado satisfatório onde só o alelo normal foi amplificado, indicando que a região de hibridação deste oligonucleótido iniciador também está deleccionada (Figura IV. 5). Isto permitiu reduzir a região de incerteza. Assim, o ponto de quebra a 3' encontra-se numa região de incerteza de cerca de 7,5kb entre as sondas nº 28 e 29. O indivíduo nº 7 também é portador da mutação drepanocítica (Figura IV. 4. A).

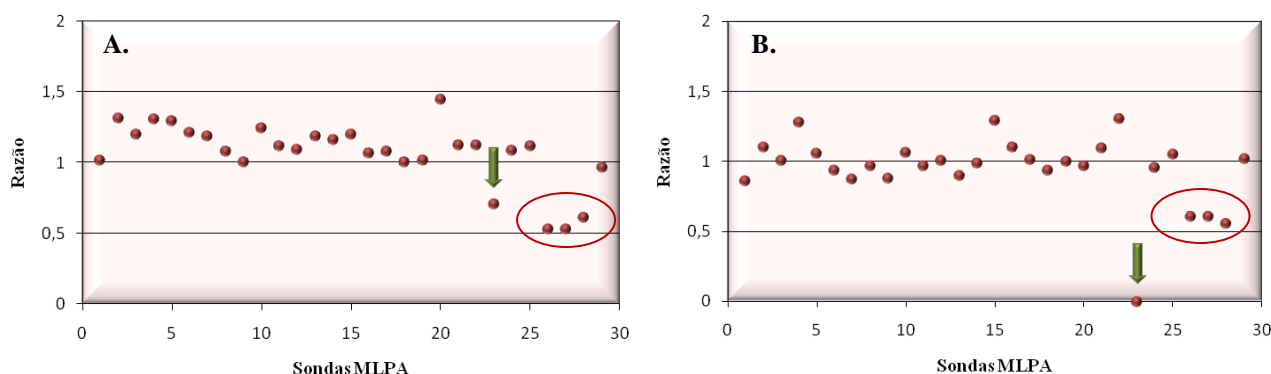


Figura IV. 4. Perfil de amplificação das sondas MLPA. **A.** Indivíduo nº7. **B.** Indivíduo nº8. As sondas nº 26, 27 e 28 [○] hibridam numa região deleccionada em heterozigotia. A sonda nº23 [↓] só amplifica na presença da mutação drepanocítica.

Tabela IV. 2. Perfil hematológico de indivíduos α - ou β -talassémicos com HbA₂ e HbF elevada

Ind. N°	Idade - Género*	GV (10 ¹² cel./L)	Hb (g/dL)	VGM (fL)	HGM (pg)	HbA ₂ (%)	HbF (%)	G γ :A γ	Xmn I	Alteração molecular ^Φ
4	Adulto - M	5,99	12,3	63,0	20,5	3,6	18,2	96:4	+/-	HBB:c.92+1G>A/N HBG2:Dupl. ^G γ /N HBG1:c.-211C>T/N
5	2 - M	4,86	11,3	73,1	23,3	4,2	8,0	100:0	+/-	HBB:c.20A>T/N HBG1:c.-211C>T/N NG_000006.1:g34164_37967del3804/N
6	Adulto - F	4,57	11,0	74,3	24,0	3,5	7,7	81:19	+/+	HBB:c.92+1G>A/N
7	Adulto - F	4,34	11,9	85,9	27,5	5,6	21,6	71:29	+/+	HBB: Del. a 3'/N HBB:c.20A>T
8	Adulto - F	5,39	12,3	72,1	22,8	5,0	10,1	nd	+/-	HBB: Del. a 3'/N
9	18-F	4,07	10,1	68,8	24,8	4,0	10,8	68:32	+/-	HBB:c.315+1G>A/N
10	Adulto - F	4,88	11,5	73,5	23,6	3,7	9,1	34:66	-/-	HBB:c.92+1G>A/N

* F- Feminino; M- Masculino; idade expressa em anos; Φ Nomenclatura HGVS; nd- não determinado

No presente ano, Phylipsen e colegas [63] descreveram uma deleção, num doente de origem Árabe, que apresenta similaridade nos pontos de quebra, pelo menos a 5', com a deleção encontrada neste estudo. Contudo, tendo em conta a diferente origem geográfica dos indivíduos (Cabo Verde e Ásia), a deleção poderá não ser a mesma, correspondendo certamente a outro evento deleccional (Figura IV. 10). Esta deleção, ao remover o último exão do gene β -globina, impede a síntese completa do mRNA e a tradução fica então comprometida, não havendo portanto produção da proteína. É uma deleção do tipo β^0 -tal, contudo, o indivíduo n°7 não apresenta microcitose nem hipocromia,

como seria de esperar, apenas a percentagem de HbA₂ está concordante com este tipo de mutação, isto é, elevada. A percentagem exageradamente elevada de HbF (21,6%) será a explicação para o facto de não apresentar microcitose nem hipocromia. As células ricas em HbF terão sido seleccionadas, e esta hemoglobina assumiu as funções da HbA, melhorando o fenótipo. A percentagem elevada de HbF pode ser consequência desta deleção, pois os promotores dos genes fetais ficam, devido à deleção, mais próximos de um *enhancer* localizado a 3' do agrupamento génico β -globina (3'HS), exacerbando assim a sua expressão. Também a presença do alelo T em homozigotia na posição -158 de γ -globina, contribui para um aumento ainda mais pronunciado da percentagem de HbF.

Também para o indivíduo n°8 a percentagem de HbF encontra-se elevada, mas não tanto (10,1%), o que pode ser explicada não só pela deleção em si, mas também pela presença, em heterozigotia, de um alelo T a -158 de γ -globina, e ainda pela mutação HPFH Cretan (Figura IV. 3. A) igualmente encontrada neste indivíduo. Sendo uma deleção β^0 -tal, e como a percentagem de HbF não é tão elevada como no indivíduo n°7, ficam esclarecidos os valores baixos de VGM e HGM deste indivíduo.

Nos indivíduos n°9 e 10, portadores de mutações β^0 -tal. (HBB:c.315+1G>A e HBB:c.92+1G>A), nada foi encontrado que explicasse a elevada percentagem de HbF, apenas um alelo T para o polimorfismo -158 do gene γ -globina no indivíduo n°9. Outros factores que influenciam a produção de HbF poderão estar presentes, tal como polimorfismos já descritos que têm esta influência, nomeadamente polimorfismos no gene *BCL11A*, na região intergénica *HMIP* e ainda nos cromossomas X e 8.

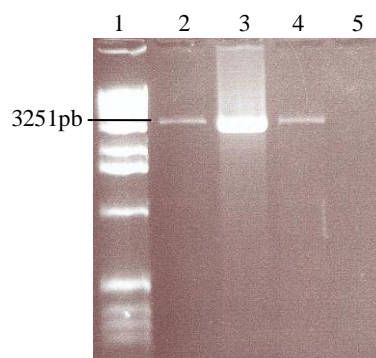


Figura IV. 5. Imagem do gel de agarose correspondente ao *gap*-PCR dos indivíduos n° 7 e 8 (terceiro e quarto poço, respectivamente). No segundo poço encontra-se uma amostra de um indivíduo normal e o último poço, constitui o controlo negativo (sem DNA).

IV. 2. 2. E com HbA₂ normalTabela IV. 3. Perfil hematológico de indivíduos α - ou β -talassémicos com HbF elevada, mas HbA₂ normal

Ind. N°	Idade- Género*	GV (10 ¹² cél./L)	Hb (g/dL)	VGM (fL)	HGM (pg)	HbA ₂ (%)	HbF (%)	G γ : A γ	Xmn I	Alteração molecular ^Φ
11	3-F	4,90	11,4	71,7	23,2	2,4	6,7	81:19	-/-	HBG2:Dupl. G γ / N HBA1:c.397G>A / N
11a	Adulto-M	5,40	14,9	82,2	27,4	2,7	2,2	68:32	+/-	HBG2:Dupl. G γ / N HBA1:c.397G>A / N
11b	Adulto-F	4,08	11,9	90,9	29,3	2,1	0,7	nd	nd	na
12	M	4,79	11,5	76,8	24,0	3,2	5,6	nd	-/-	nd
13	38-F	4,20	10,0	76,4	23,8	2,1	8,6	13:87	-/-	HBG1:c.-248C>G/ N
14	F	4,13	8,9	63,9	21,6	1,6	18,1	nd	+/+	Delecção total do agrupamento génico β -globina/ N
14a	Adulto-M	5,47	12,0	69,1	22,0	2,6	nd	nd	nd	na
14b	Adulo- F	4,62	11,4	75,0	24,7	2,9	nd	nd	nd	na
15	Adulto-M	6,03	12,5	64,1	20,7	2,2	nd	nd	-/-	Delecção total do agrupamento génico β -globina/ N
16	40-F	5,07	10,6	65,5	20,8	2,2	33,0	23:77	nd	NG_000007.3:g.59478_144395 del84918/N NG_000006.1:g.34164_37967d el3804/N

* F- Feminino; M- Masculino; idade expressa em anos; 11a- Pai do indivíduo n°11; 11b- Mãe do indivíduo n°11; 14a- Pai do indivíduo n°14; 14b- Mãe do indivíduo n°14; Φ Nomenclatura HGVS; na- não aplicável; nd- não determinado

Os indivíduos n°11, 11a e 11b (Tabela IV. 3), correspondem a um estudo familiar, que devido à elevada percentagem de HbF da filha, esta foi analisada por MLPA. Foi detectado, por esta técnica, a duplicação do gene G γ -globina na filha, e mais tarde também no pai (Figura IV. 6. B e C). Tal explica a elevada percentagem de HbF e a razão G γ :A γ desviada para G γ -globina. Para além disto, o pai e a filha são também portadores da variante nova α -globina descrita pela primeira vez neste laboratório, denominada Hb Portimão, (HBA1:c.397G>A) (<http://globin.bx.psu.edu/>). Esta mutação em α -globina deverá ser a causa molecular para os valores mais baixos de VGM e HGM. Apesar de apresentarem a mesma alteração molecular, o perfil hematológico da filha é ligeiramente mais grave, sendo esse facto justificado pela tenra idade apresentada pela criança (3 anos).

O indivíduo nº12 (Tabela IV. 3.) mostrou-se deveras intrigante, uma vez que não foi detectada qualquer anomalia molecular, quer por sequenciação, como por MLPA, que justificasse a anemia hipocrômica microcítica. Também nada foi detectado no agrupamento génico α -globina. Este caso fica então por esclarecer. Não menos intrigante foi o caso do indivíduo nº13. A técnica de MLPA aplicada para estudar este indivíduo nada detectou, seguiu-se então a sequenciação dos promotores dos genes fetais que revelaram a presença, em heterozigotia, da mutação C>G na posição -195 de $A\gamma$ -globina (HBG1:c.-248C>G), denominada HPFH Brasileira [64] (Figura IV. 7.). Esta corresponde a um tipo de HPFH não deleccional caracterizada por exacerbar a expressão da cadeia $A\gamma$ -globina [65], desviando a razão $G\gamma:A\gamma$ para $A\gamma$ -globina, e ainda por percentagens de HbF elevadas. Esta alteração explica por si a razão $G\gamma:A\gamma$ e a percentagem de HbF, mas nenhuma alteração molecular

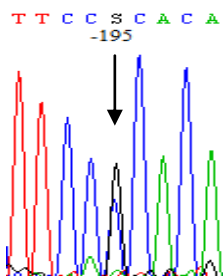


Figura IV. 7. Sequenciação do promotor do gene $A\gamma$ -globina. HPFH Brasileira, mutação C>G na posição -195, em heterozigotia, detectada nos indivíduos nº 13, 17, 17a, 18, 18a e 19.

foi

encontrada neste indivíduo que explicasse os valores baixos de VGM e HGM. O estudo do agrupamento génico α -globina não foi possível pois o DNA desta amostra mostrou-se degradado. Para estes dois casos anteriores (nº12 e 13), uma anemia ferropénica pode ser a explicação para os seus fenótipos hematológicos.

O indivíduo nº14 foi estudado directamente por MLPA, pois suspeitava-se que fosse portador de uma deleção no

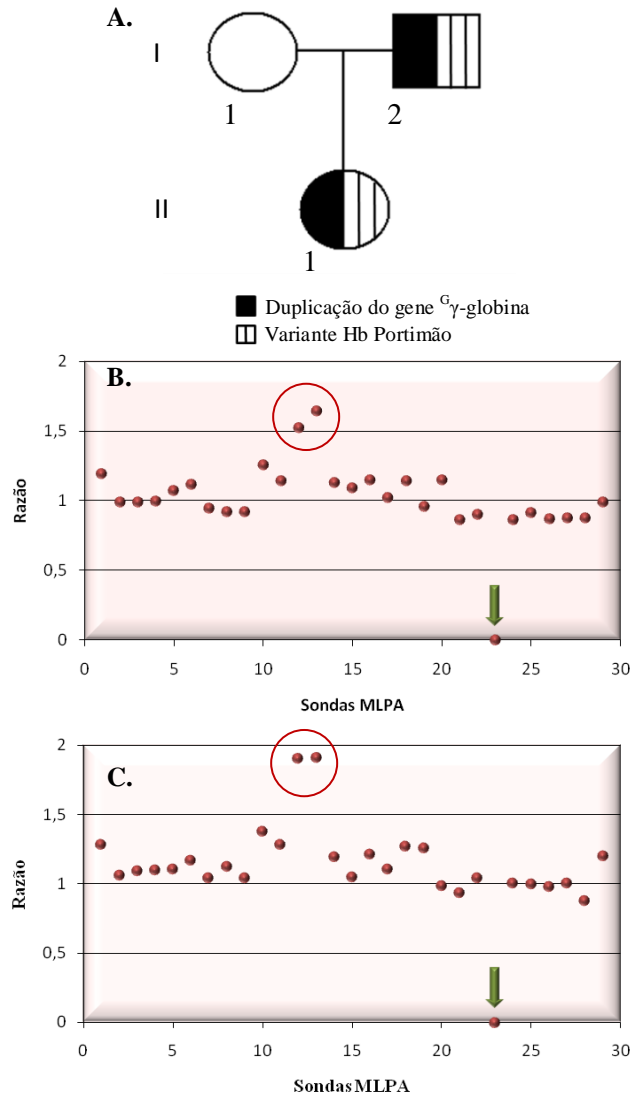


Figura IV. 6. A. Árvore genealógica da família do indivíduo nº 11. B. Perfil de amplificação das sondas MLPA do indivíduo nº11. C. Perfil de amplificação das sondas MLPA do indivíduo nº11a. As sondas 12 e 13 [○] apresentam uma razão correspondente a uma duplicação. A sonda nº 23 [↓] só amplifica na presença da mutação drepanocítica.

agrupamento génico β -globina, devido à elevada percentagem de HbF e ainda à estranha homozigotia verificada para todos os polimorfismos, aquando da determinação do seu haplótipo. De facto, o perfil de MLPA mostrou a presença, em heterozigotia, de uma deleção que remove todo o agrupamento génico β -globina (Figura IV. 8. A), verificando-se o abaixamento, para cerca de 0,5, da razão de todas as sondas comerciais, excepto a sonda n°1, que se encontra a 1Mb, a montante do agrupamento. O estudo da família deste indivíduo não foi possível, uma vez que o DNA dos pais não se encontrava em condições para efectuar o estudo. No entanto, avaliando o perfil hematológico e sabendo que a mãe sofre de anemia ferropénica, factor responsável pelos valores diminuídos de VGM e HGM, pode-se inferir que o indivíduo estudado recebeu o alelo mutado do seu pai. O mesmo perfil de MLPA foi obtido para o indivíduo n°15

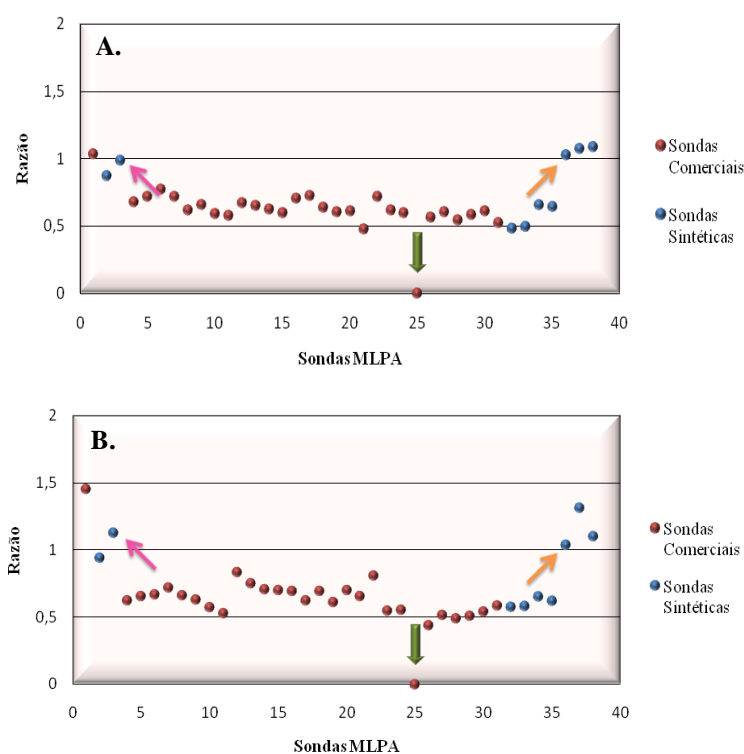


Figura IV. 8. Perfil de amplificação das sondas MLPA. **A.** Indivíduo n°14. **B.** Indivíduo n°15. [●] Sondas MLPA comerciais; [●] Sondas MLPA sintéticas. A seta [↖] assinala a primeira sonda que híbrida numa região com duas cópias genómicas a montante do ponto de quebra a 5' da deleção. A seta [↗] assinala a primeira sonda que híbrida numa região com duas cópias genómicas a jusante do ponto de quebra a 3' da deleção. A sonda n°25 [↓] amplifica na presença da mutação drepanocítica.

(Figura IV. 8. B). Neste caso, como não havia informação sobre a percentagem de HbF e a percentagem de HbA₂ era normal, foi primeiramente estudado para o agrupamento génico α -globina. Este estudo não foi conclusivo e deste modo decidiu-se estudar o agrupamento génico β -globina directamente por MLPA. O haplótipo deste indivíduo também foi concordante com a presença da deleção total do agrupamento génico β -globina, pois apenas se obtiveram supostas homozigotias, tratando-se afinal de hemizigotias.

Estes dois indivíduos foram então estudados em simultâneo, com a finalidade de obter uma maior definição dos pontos de quebra das deleções encontradas. Para tal, foram desenhadas sondas MLPA sintéticas que hibridassem em regiões a montante e a jusante da deleção. Foram escolhidas preferencialmente seqüências codificantes, nomeadamente de genes de

receptores olfactivos (OR- *Olfactor Receptor*), entre os quais se encontra o agrupamento génico β -globina, no entanto quando tal não foi possível, algumas sondas foram desenhadas para hibridarem em pseudogenes (Anexo D). O resultado foi semelhante para ambos os indivíduos, tratando-se muito provavelmente da mesma deleção (Figura IV. 8). Também o facto de ambos os indivíduos serem originários de localidades da mesma região de Portugal, corrobora a suposição anterior. Esta deleção terá o ponto de quebra a 5' numa região de incerteza de cerca de 6,5 kb entre o gene *OR51B4* (sonda nº3) e o HS5 (sonda nº4). O ponto de quebra a 3' situa-se numa região de incerteza de 11,4kb entre os pseudogenes *OR52JIP* (sonda nº35) e *OR52E3P* (sonda nº36) (Figura IV. 10). Esta deleção tem um tamanho máximo de aproximadamente 208kb e mínimo de cerca de 190kb. De entre as deleções descritas, encontra-se a deleção Irish ($\epsilon\gamma\delta\beta^0$ -tal) [66] que tem um tamanho semelhante, contudo os seus pontos de quebra têm localização diferente (Figura IV. 10). Neste trabalho é descrita uma nova deleção, que dá origem a uma $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talassémia, com a LCR também deleccionada (Figura IV. 10). Esta deleção, como remove todo o agrupamento génico β -globina, um dos genes β -globina não é expresso, o que explica os valores baixos verificados para os parâmetros hematológicos de VGM e HGM de ambos os indivíduos. A percentagem de HbA₂ está diminuída em relação ao que seria de esperar, pois só um alelo expressa a cadeia δ -globina, no entanto a percentagem de HbF no indivíduo nº14 é elevada. Os genes fetais do alelo normal estão a ser sobre-expressos, compensando assim a falta de HbA.

Também o facto de o alelo normal possuir T na posição -158 de ^G γ -globina pode influenciar o aumento de HbF. Para o indivíduo nº15, apesar de não haver informação, também seria de esperar que se verificasse uma elevada expressão dos genes fetais, mas a percentagem de HbF poderia ser inferior já que o alelo normal contém C na posição -158 de ^G γ -globina.

Para estes dois indivíduos torna-se necessário um correcto diagnóstico de $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talassémia e não, por exemplo, de α -talassémia, o que pode ser sugerido devido à diminuição, para valores normais, da percentagem de HbA₂. Estes dois casos são exemplos que contrariam o típico fenótipo hematológico de portadores de β -talassémia. Deste modo, assim como alguns indivíduos acima descritos, estes também correm o risco de ter descendência gravemente doente, caso haja a fatalidade desta ainda receber do outro progenitor um alelo com mutação no gene β -globina.

Para o indivíduo nº16 (Tabela IV. 3.), aplicou-se a técnica de MLPA pois também se suspeitava, devido à elevada percentagem de HbF, da presença de uma deleção. De facto, verificou-se a redução da razão de todas as sondas MLPA comerciais a partir da sonda nº16, para cerca de metade (Figura IV. 9.). Com a finalidade de mapear o ponto de quebra a 3' desta

delecção, foi realizado um novo ensaio de MLPA utilizando algumas das sondas sintéticas desenhadas para estudar os indivíduos nº14 e 15 (Sondas nº32, 33, 34 e 35, Anexo D). O perfil de MLPA obtido é compatível com a delecção HPFH-1 (Black) [67] (NG_000007.3:g.59478_144395del84918).

Nesta delecção, típica de populações negras, são delecionados 84918 nucleótidos a partir de uma sequência repetitiva da família ALU, localizada a cerca de 4kb a montante do gene δ -globina (Figura IV. 10). Esta delecção está descrita como não tendo

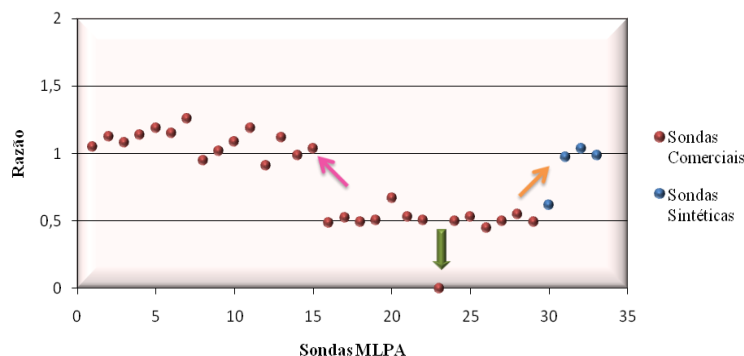


Figura IV. 9. Perfil de amplificação das sondas MLPA do indivíduo nº16. [●] Sondas comerciais MLPA; [●] Sondas sintéticas MLPA. A seta [↖] assinala a primeira sonda que híbrida numa região com duas cópias genómicas a montante do ponto de quebra a 5' da delecção. A seta [↗] assinala a primeira sonda que híbrida numa região com duas cópias genómicas a jusante do ponto de quebra a 3' da delecção. A sonda nº23 [↓] só amplifica na presença da mutação drepanocítica.

qualquer influência nos parâmetros hematológicos dos seus portadores, apenas associada a percentagens de HbF elevadas (entre 20 a 30%) (<http://globin.bx.psu.edu/>). No entanto, neste caso, é evidente uma microcitose e hipocromia. Pensou-se então, devido à gravidade do perfil hematológico, que estivesse presente alguma alteração molecular no agrupamento génico α -globina e de facto foi detectada, por *gap*-PCR, a delecção $-\alpha^{3,7kb}$ em heterozigotia. Este caso ficou então esclarecido.

IV. 3. Indivíduos não talassémicos com HbF elevada (HPFH)

Para indivíduos com perfil hematológico normal, mas que apresentavam uma percentagem de HbF anormalmente elevada, tendo alguns ainda uma razão $G\gamma:A\gamma$ completamente desviada (Tabela IV. 4.), procedeu-se à amplificação seguida de sequenciação dos promotores dos genes fetais. Esta revelou, excepto para o indivíduo nº20, a mutação em heterozigotia, HBG1:c.-248C>G (Figura IV. 7), que origina um tipo de HPFH não delecional, a HPFH Brasileira, responsável pelo aumento da percentagem de HbF devido à sobre-expressão da cadeia $A\gamma$ -globina. No entanto, no indivíduo nº19 verifica-se uma razão $G\gamma:A\gamma$ contrária ao esperado. A sequenciação dos genes fetais não permitiu esclarecer este caso.

Tabela IV. 4. Perfil hematológico de indivíduos não talassémicos com HPFH

Ind. N°	Idade-Género*	GV (10 ¹² cél./L)	Hb (g/dL)	VGM (fL)	HGM (pg)	HbA ₂ (%)	HbF (%)	G γ : A γ	Xmn I	Alteração molecular ^Φ
17	27-M	4,83	15,0	92,1	31,1	1,9	9,5	0:100	-/-	HBG1:c.-248C>G/ N
17a	Adulto-M	5,17	15,5	89,4	30,0	2,2	6,2	0:100	+/-	HBG1:c.-248C>G/ N
18	F	4,71	14,9	96,7	31,6	1,9	10,8	nd	-/-	HBG1:c.-248C>G/ N
18a	Adulto-M	5,40	17,9	100	33,2	2,0	11,7	0,16	+/-	HBG1:c.-248C>G/ N
19	66-M	3,94	12,9	95,7	32,8	nd	4,2	100:0	+/-	HBG1:c.-248C>G/ N
20	F	4,25	12,0	85,1	28,3	1,9	7,2	64:36	+/+	HBG1: normal HBG2: normal
20a	Adulto-F	5,39	11,3	65,9	21,0	4,0	6,4	61:39	+/-	HBB:c.118C>T C>T/N
20b	Adulto-M	4,72	14,7	95,1	31,2	2,3	0,5	nd	+/-	HBG1: normal HBG2: normal

* F- Feminino; M- Masculino; idade expressa em anos; 17a- Pai do indivíduo n°17; 18a- Pai do indivíduo n°18; 20a- Mãe do indivíduo n°20; 20b- Pai do indivíduo n°20; Φ Nomenclatura HGVS; nd- não determinado

O indivíduo n°20 recebeu de ambos os progenitores o alelo T na posição -158 de G γ -globina, o que poderá explicar a elevação da percentagem de HbF total. Dado que o indivíduo não herdou da sua mãe a mutação no gene β -globina, esta não estará em *cis* com a mutação em -158 de G γ -globina.

O facto de estes indivíduos terem percentagem elevada de HbF não representa qualquer patologia, já que esta Hb também transporta eficientemente o oxigénio para os tecidos.

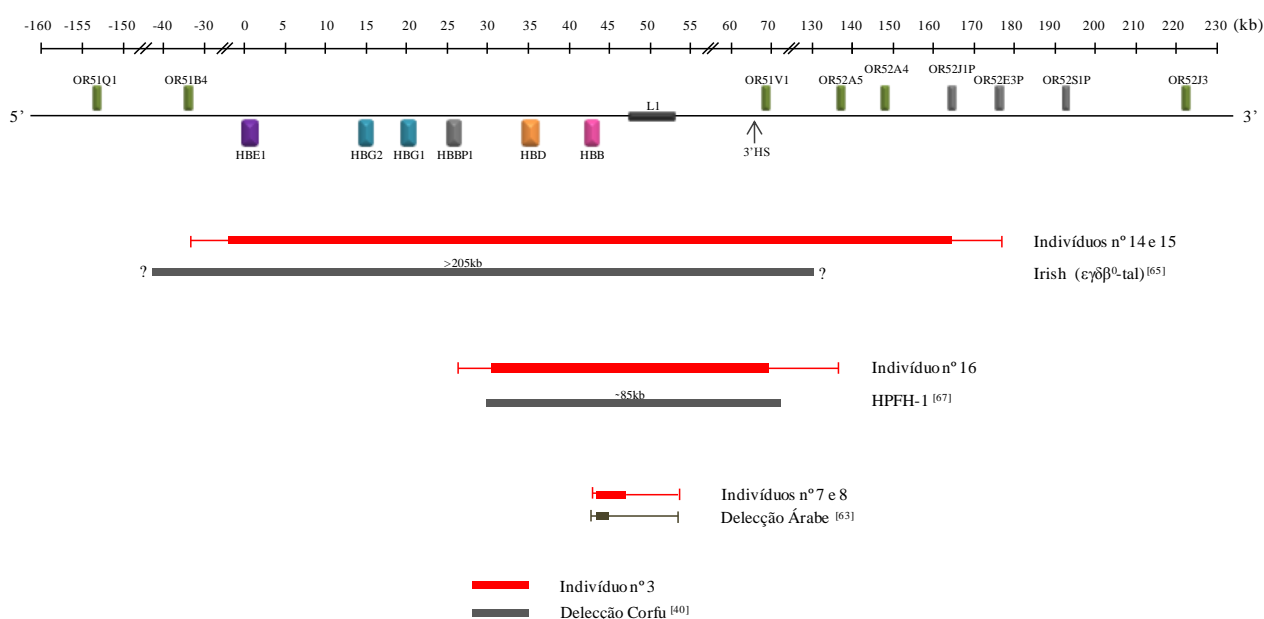


Figura IV. 10. Esquema do agrupamento génico β -globina e dos genes de receptores olfactivos que o rodeiam, no cromossoma 11p15.5. Representação das deleções identificadas neste estudo (representadas a vermelho) e das deleções descritas mais semelhantes a elas (representadas a cinza).

V. CONCLUSÃO

Com este estudo foi possível esclarecer casos clínicos β -talassémicos atípicos que se encontravam “mascarados” por mutações noutros genes concomitantes com a do gene β -globina, e que alteram o fenótipo típico de portadores β -talassémicos, nomeadamente normalizando o nível de HbA₂. Nestes casos é importante obter um correcto diagnóstico de portador de β -talassémia pois, de outro modo, o tratamento escolhido para a patologia erroneamente diagnosticada não é, muito provavelmente, a indicada para o tratamento da patologia real. Por exemplo, indivíduos β -talassémicos com HbA₂ normal ou diminuída, podem ser erradamente diagnosticados como portadores presumivelmente de α -talassémia ou de anemia ferropénica. O indivíduo pode ser medicado com toma oral de ferro, o que consequentemente resulta numa acumulação deste no organismo podendo causar distúrbios fisiológicos ou mesmo em hemocromatose secundária. O indivíduo portador de β -talassémia, e não o sabendo, pode fazer parte de um casal em risco, o qual escapa ao aconselhamento genético, havendo assim a possibilidade surgirem na população mais casos graves da patologia.

Também foi possível perceber a causa molecular para a elevada percentagem de HbF encontrada em alguns indivíduos hematologicamente normais ou portadores de talassémia, que apesar de não ter qualquer efeito patológico no indivíduo, permite elucidar como estes genes são regulados e ainda a interacção/competição com os restantes genes β -globínicos.

Para o esclarecimento de alguns destes casos clínicos, a metodologia de MLPA foi crucial, pois a detecção de grandes deleções, particularmente as desconhecidas, responsáveis pelo fenótipo β -talassémico, não é exequível por métodos mais usuais.

Neste trabalho foi descoberta, pelo menos, uma nova deleção que remove, por completo, o agrupamento génico β -globina. Também a deleção que remove parte do gene β -globina, e que se estende até à região repetitiva L1, poderá muito provavelmente ser nova, uma vez que a única deleção descrita semelhante a esta foi encontrada num indivíduo de origem geográfica muito diferente, e ter portanto o ponto de quebra a 3'diferente, pois já foram descritas várias deleções que terminam nesta região mas em locais diferentes ^[68].

Da análise e comparação dos resultados obtidos obtém-se uma melhor compreensão da regulação da expressão dos genes β -globínicos, do efeito que mutações num gene têm sobre a expressão dos restantes genes. Devido à organização e complexa regulação do agrupamento β -globina, observa-se a capacidade do organismo de responder à escassez de uma cadeia globínica exacerbando a expressão de outra que a substitua, e assim permitir a sua sobrevivência.

VI. PERSPECTIVAS FUTURAS

Para futuro, valoriza-se a implementação da metodologia de MLPA no laboratório de diagnóstico molecular de hemoglobinopatias, para o estudo do agrupamento génico β -globina, onde, apesar de raras, podem ocorrer deleções extensas que por outras técnicas seria difícil e demorado obter resultados. No entanto, esta técnica é apenas o primeiro passo para um estudo de caracterização molecular, pois não permite uma localização exacta dos pontos de quebra, apesar de admitir a construção de sondas sintéticas pelo utilizador. A informação que fornece deve ser então complementada recorrendo a outras técnicas como o *gap*-PCR. Portanto, para as deleções encontradas neste estudo, falta ainda determinar com exactidão os seus pontos de quebra, podendo-se assim calcular o tamanho preciso da sequência deleccionada.

Para os casos de indivíduos onde não foram detectadas quaisquer alterações a nível molecular, quer no agrupamento génico α -globina quer no agrupamento génico β -globina, que justificassem os seus fenótipos hematológicos, terão de ser consideradas diferentes estratégias para detectar as alterações que poderão estar associadas a factores genéticos não globínicos. Fica também por esclarecer o caso do indivíduo nº19, que apesar de ser portador de HPFH Brasileira, apresenta uma razão $^G\gamma:A\gamma$ contrária à esperada.

Os casos molecularmente diagnosticados graças a este estudo foram, quando adequado, enviados juntamente com as suas famílias para consultas de aconselhamento genético, o que, no futuro, trará a estas famílias mais conhecimentos sobre a doença e a possibilidade de prevenir o aparecimento de novos casos graves.

As novas deleções identificadas durante este estudo irão ser objecto de publicação científica.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. G. Stamatoyannopoulos *et al*, The molecular basis of blood diseases, W.B. Saunders, 2nd Ed. (1994)
2. D. R. Higgs *et al*, A major positive regulatory region located far upstream of the human alpha-globin gene locus, *Genes Dev.* 4: 1588-1601 (1990)
3. J. Borg *et al*, Genetic recombination as a major cause of mutagenesis in the human globin gene clusters, *Clinical Biochemistry* 42: 1839-1850 (2009)
4. P. P. Levings and J. Bungert. The human β -globin locus control region, *Eur. J. Biochem.* 269: 1589-1599 (2002)
5. S. Shen *et al*, A history of the human fetal globin gene duplication, *Cell* 26: 191-203 (1981)
6. R. J. Trent *et al*, A novel rearrangement of the human β -like globin gene cluster, *Nucleic Acids Res.* 9: 6723-6733 (1981)
7. P. K. Sukumaran *et al*, Gamma thalassemia resulting from the deletion of a γ -globin gene, *Nucleic Acids Res* 11: 4635-4643 (1983)
8. D. J. Weatherall e J. B. Clegg, The thalassemia syndromes, Blackwell Scientific Publication, Oxford, 3rd Ed. (1981)
9. D. R. Higgs *et al*, A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster, *Blood* 73: 1081-1104 (1989)
10. A. Mosca *et al*, The relevance of hemoglobin F measurement in the diagnosis of thalassemias and related hemoglobinopathies, *Clin Biochem* 42: 1797-1801 (2009)
11. S. Harju *et al*, Chromatin structure and control of β -like globin gene switching, *Exp. Biol. Med.* 227: 683-700 (2002)
12. B. J. Bain, Haemoglobinopathy Diagnosis, Oxford: Blackwell Publishing, 1^aEd. (2001)
13. E. Anguita *et al*, Globin gene activation during haematopoiesis is driven by protein complexes nucleated by GATA-1 and GATA-2, *EMBO J* 23: 2841-2853 (2004)
14. Y. Tang *et al*, Further understanding of the β -globin locus regulation at the molecular level: looping or linking models?, *Genes Cells* 7: 889-900 (2002)
15. K. D. Johnson *et al*, Cooperative activities of hematopoietic regulators recruit RNA Polymerase to a tissue-specific chromatin domain, *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11760-11765 (2002)
16. C. R. Vakoc *et al*, Proximity among distant regulatory elements at the beta-globin locus requires GATA-1 and FOG-1, *Mol Cell* 17: 453-462 (2005)
17. S. Liang *et al*, Locus control region mediated regulation of adult β -globin gene expression, *J Cell Biochem* 105: 9-16 (2008)
18. T. Sengupta, *et al*, Acetylation of EKLF is essential for epigenetic modification and transcriptional activation of the β -globin locus, *Mol Cell Bio* 28:6161-6170 (2008)
19. T. Sawado *et al*, Activation of β -major globin gene transcription is associated with recruitment of NF-E2 to the β -globin LCR and gene promoter, *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10226-10231 (2001)
20. C-Y. Gui and A. Dean, A major role for the TATA box in recruitment of chromatin modifying complexes to a globin gene promoter, *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7009-7014 (2003)
21. C. Driscoll *et al*, $\gamma\delta\beta$ -thalassemia due to a de novo mutation deleting the 5' β -globin locus activation-region hypersensitive sites, *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7470-7474 (1989)
22. P. Curtin *et al*, A distant deletion affects β -globin gene function in an atypical $\gamma\delta\beta$ -thalassemia, *J Clin Invest* 76: 1554-1558 (1985)
23. P. A Navas *et al*, Activation of the beta-like globin genes in transgenic mice is dependent on the presence of the beta-locus control region, *Hum Mol Genet* 15; 11: 893-903 (2002)
24. K. R. Peterson *et al*, Effect of deletion of 5'HS3 or 5'HS2 of the human beta-globin locus control region on the developmental regulation of the globin gene expression in beta-globin locus yeast artificial chromosome transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6605-6609 (1996)
25. M. A. Bender *et al*, Targeted deletion of 5'HS1 and 5'HS4 of the β -globin locus control region reveals additive activity of the DNase I hypersensitive sites, *Blood* 98: 2022-2027 (2001)
26. B. Pace and S. Zein. Understanding mechanisms of γ -globin gene regulation to develop strategies for pharmacological fetal hemoglobin induction, *Dev Dyn* 235: 1727-1737 (2006)

27. Y-N. Ma *et al*, Screening for *trans*-acting factors and other factors involved in the activation or silencing of the γ -globin gene during human ontogeny, *Biochem Cell Biol* 85: 347-357 (2007)
28. V. G. Sankaran *et al*, Human fetal hemoglobin expression is regulated by developmental stage-specific repressor *BCL11A*. *Science* 322: 1839-1842 (2008)
29. D. J. Weatherall and J-B. Clegg, Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem, *Bull World Health Organ* 79: 704-712 (2001)
30. L. F. Bernini, α -Thalassaemia, *Baillière's Clin. Haem.* 11 (1998)
31. J. B. Clegg and D. J. Weatherall, Thalassaemia and malaria: new insights into an old problem, *Proc Assoc Am Physicians* 111: 278-282 (1999)
32. M. C. Martins *et al*, Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance and control, *J Med Genet.* 30: 232-239 (1993)
33. P. Faustino *et al*, The geographic pattern of β -thalassaemia mutations in the Portuguese population. *Br J Haematol.* 107: 903-904 (1999)
34. S. L. Thein, β -thalassaemia prototype of a single gene disorder with multiple phenotypes, *Int J Hematol* 76: 96-104 (2002)
35. G. M. Clarke and T. N. Higgins, Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemsias: review and update, *Clin Chem* 46:1284-1290 (2000)
36. J. M. Old, Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders, *Blood Rev.*17: 43-53 (2003)
37. S. M. Lewis *et al*, Dacie and Lewis Practical Haematology, Churchill Livingstone Elsevier 10nd Ed. (2006)
38. G. Lacerra *et al*, Molecular evidences of single mutational events followed by recurrent crossing-overs in the common δ -globin alleles in the Mediterranean area, *Gene* 410: 129-138 (2008)
39. M. D. Angioletti *et al*, Epidemiology of the delta globin alleles in Southern Italy shows complex molecular, genetic, and phenotypic features, *Hum Mutat* 20: 358-367 (2002)
40. J. S. Wainscoat *et al*, A novel deletion in the beta-globin gene complex, *Ann N Y Acad Sci* 445: 20-27 (1985)
41. R. Galanello *et al*, Deletion δ -thalassemia: the 7.2kb deletion of Corfu $\delta\beta$ -thalassemia in a non- β -thalassemia chromosome, *Blood* 75: 1747-1749 (1990)
42. C. L. Harteveld *et al*, Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing α - and β -thalassaemia characterized by high resolution multiplex ligation-dependent probe amplification, *J Med Genet* 42: 922-931 (2005)
43. A. E. Gallienne *et al*, Multiplex ligation-dependent probe amplification identification of 17 different β -globin gene deletions (including four novel mutations) in the UK population, *Hemoglobin* 33: 406-416 (2009)
44. P. Joly *et al*, Identification and molecular characterization of four new large deletions in the beta-globin gene cluster, *Blood Cells Mol Dis.* 43: 53-7 (2009)
45. S-T. Lee *et al*, Multiplex ligation-dependent probe amplification screening of isolated increased HbF levels revealed three cases of novel rearrangements/deletions in the β -globin gene cluster, *Br J Haematol* 148: 154-160 (2010)
46. B. G. Forget, Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin, *Ann N Y Acad Sci* 30: 38-44 (1998)
47. S. Ottolenghi *et al*, DNA sequences regulating human globin gene *transcription* in non-deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin, *Hemoglobin* 13: 523-54 (1989)
48. T. K. Nguyen *et al*, The XmnI ^G γ polymorphism influences hemoglobin F synthesis contrary to *BCL11A* and *HBS1L-MYB* SNPs in a cohort of 57 β -thalassaemia intermedia patients, *Blood Cells Mol Dis* 45: 124-127 (2010)
49. J. Leonova, E.G. Kazanetz, N.S. Smetanina. Variability in the fetal hemoglobin level of the normal adult, *Hematology* 53: 1468-1474 (1996)
50. R. Galanello and R. Origa, Beta-thalassaemia, *Orphanet J Rare Dis*21: 11 (2010)
51. S. L. Thein, Genetic modifiers of the β -haemoglobinopathies, *Br J Haematology* 141: 357-366 (2008)
52. C. Garner *et al*, A candidate gene study of Fcell levels in sibling pairs using a joint linkage and association analysis. *Gene-Screen* 1: 9-14 (2000)
53. F. Mastropietro e G. Modiano, Factors regulating HbF synthesis in thalassaemia diseases, *BMC Blood Disordr* 2 (1):2, (2002)
54. S. Zertal-Zidani, Foetal haemoglobin in normal healthy adults: relationship with polymorphic sequences cis to the β -globin gene, *Eur Jl of Hum Genet* 10: 320-326 (2002)

55. Thein S-L, et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major QTL on chromosome 6q23 influencing HbF levels in adults. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 104: 11346-11351 (2007)
56. C. P. Garner *et al*, Evidence of genetic interaction between the beta-globin complex and chromosome 8q in the expression of fetal hemoglobin, *Am. J. Hum Genet* 70: 793-9 (2002)
57. G. J. Dover *et al*, Fetal hemoglobin levels in sickle cell disease and normal individuals are partially controlled by an X-linked gene at Xp22.2, *Blood* 80: 816-824 (1992)
58. M. Uda *et al*, Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistence fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of β -thalassemia, *Nac Aca Sci USA* 105: 1620-1625 (2008)
59. J. Schouten *et al*, Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002)
60. P. Trifillis *et al*, Identification of four novel delta-globin gene mutations in Greek Cypriots using polymerase chain reaction and automated fluorescence-based DNA sequence analysis, *Blood* 78: 3298-3305 (1991)
61. A. E. Kulozik *et al*, The Corfu delta beta zero thalassemia: a small deletion acts at a distance to selectively abolish beta globin gene expression, *Blood* 71: 457-462 (1988)
62. G. P. Patrinos *et al*, The Cretan type of non-deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin [$A\gamma$ -158C>T] results from two independent gene conversion events, *Hum Genet* 102: 629-634 (1998)
63. M. Phylipsen *et al*, Thalassemia in Western Australia: 11 novel deletions characterized by multiplex ligation-dependent probe amplification, *Blood Cells Mol Dis* 44: 146-151 (2010)
64. F. F. Costa *et al*, 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)
65. A. F. Cunha *et al*, High levels of human gamma-globin are expressed in adult mice carrying a transgene of the Brazilian type of hereditary persistence of fetal hemoglobin ((A)gamma-195), *Hemoglobin* 33: 439-447 (2009)
66. P. Fortina *et al*, A >200kb deletion removing the entire β -like globin gene cluster in a family of Irish descent, *Hemoglobin* 15: 23-41 (1991)
67. P. Jagadeeswaran *et al*, A gene deletion ending at the midpoint of a repetitive DNA sequence in one form of hereditary persistence of fetal haemoglobin, *Nature* 296: 469-470 (1982)
68. P. S. Henthorn *et al*, 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)

Anexo A Oligonucleótidos iniciadores, condições de PCR e *gap*-PCR

Tabela A. 1 Oligonucleótidos iniciadores, mistura de reacção e condições de PCR utilizadas na amplificação da região 5' do gene β -globina

Oligonucleótidos Iniciadores		Tm	Mistura de reacção (volume final de 50mL)	μ L	Condições de PCR	
Directo	TAAGCCAGTGCCAGAAGAG	54,4 °C	Tampão de PCR	5,0	94°C, 5min	
			BSA (10m/mL)	0,7		
			dNTPs	1,0	94°C, 30s	30 Ciclos
			O. I. Directo (25pmol/mL)	1,0	60°C, 30s	
Reverso	TCCCATTCTAAACTGTAC	51,4 °C	O. I. Reverso (25pmol/ml)	1,0	72°C, 30s	
			Taq Polimerase (5U/ μ L)	0,2		
			H ₂ O bidestilada	40,1		
			DNA molde	1,0		

Tabela A. 2 Oligonucleótidos iniciadores, mistura de reacção e condições de PCR utilizadas na amplificação da região 3' do gene β -globina

Oligonucleótidos Iniciadores		Tm	Mistura de reacção (volume final de 50mL)	μ L	Condições de PCR	
Directo	CAATGTATCATGCCTCTTTG CACC		Tampão de PCR	5,0	94°C, 5min	
			BSA (10m/mL)	0,7		
			dNTPs	1,0	94°C, 30s	30 Ciclos
			O. I. Directo (25pmol/mL)	1,0	60°C, 30s	
Reverso	GAGTCAAGGCTGAGAGATG CAGGA		O. I. Reverso (25pmol/ml)	1,0	72°C, 30s	
			Taq Polimerase (5U/ μ L)	0,2		
			H ₂ O bidestilada	40,1		
			DNA molde	1,0		

Tabela A. 3 Oligonucleótidos iniciadores, mistura de reacção e condições de PCR utilizadas na amplificação da região 5' do gene δ -globina

Oligonucleótidos Iniciadores		Tm	Mistura de reacção (volume final de 50mL)	μ L	Condições de PCR	
Directo	GGGCAAGTTAAGGGAATA	48,9 °C	Tampão de PCR	5,0	94°C, 5min	
			BSA (10m/mL)	0,7		
			dNTPs	1,0	94°C, 1min	30 Ciclos
			O. I. Directo (25pmol/mL)	1,0	55°C, 1min	
Reverso	GGAGAAGAGGCAGGTAGGT	57,9 °C	O. I. Reverso (25pmol/ml)	1,0	72°C, 1min	
			Taq Polimerase (5U/ μ L)	0,2		
			H ₂ O bidestilada	40,1		
			DNA molde	1,0		

Tabela A. 4 Oligonucleótidos iniciadores, mistura de reacção e condições de PCR utilizadas na amplificação do promotor do gene γ -globina

Oligonucleótidos Iniciadores		Tm	Mistura de reacção (volume final de 50mL)	μ L	Condições de PCR	
Directo	GCACTGAAACTGTTGCTTTAT AGGAT	55,7 °C	Tampão de PCR	5,0	94°C, 5min	
			BSA (10m/mL)	0,7		
			dNTPs	1,0	94°C, 1min	30 Ciclos
			O. I. Directo (25pmol/mL)	1,0	55°C, 1min	
Reverso	TGGCGTCTGGACTAGGAGCTT ATT	59,5 °C	O. I. Reverso (25pmol/ml)	1,0	72°C, 1min	
			Taq Polimerase (5U/ μ L)	0,2		
			H ₂ O bidestilada	40,1		
			DNA molde	1,0		

Tabela A. 5 Oligonucleótidos iniciadores, mistura de reacção e condições de PCR utilizadas na amplificação do promotor do gene γ -globina

Oligonucleótidos Iniciadores		Tm	Mistura de reacção (volume final de 50mL)	μ L	Condições de PCR	
Directo	TGAAACTGTGGTCTTTATGAAA ATTG	52,6 °C	Tampão de PCR	5,0	94°C, 5min	
			BSA (10m/mL)	0,7		
			dNTPs	1,0	94°C, 1min	30 Ciclos
O. I. Directo (25pmol/mL)	1,0	55°C, 1min				
Reverso	TGGCGTCTGGACTAGGAGCTTA TT	59,5 °C	O. I. Reverso (25pmol/ml)	1,0	72°C, 1min	
			Taq Polimerase (5U/ μ L)	0,2		
			H ₂ O bidestilada	40,1		
			DNA molde	1,0		

Tabela A. 6 Oligonucleótidos iniciadores, mistura de reacção e condições de PCR utilizadas na pesquisa da deleção Corfu

Oligonucleótidos Iniciadores		Tm	Mistura de reacção (volume final de 50mL)	μ L	Condições de PCR	
Directo	ACAGAGAGTCAGAGATGACA	52,2 °C	Tampão de PCR	5,0	94°C, 5min	
			BSA (10m/mL)	0,7		
Directo	GAACAGGGTTTCTGAGTCAAGA CAC	57,5 °C	dNTPs	1,0	94°C, 1min	30 Ciclos
			O. I. (25pmol/mL)	1,0 cada	55°C, 1min	
72°C, 1'30min						
Reverso	GTGTCACCCATTAATGCCTTGT AC	56,1 °C	Taq Polimerase (5U/ μ L)	0,3	72°C, 10min	
			Reverso	CAGTATTCTATGCCTCTCAT		
DNA molde	1,0					

Tabela A. 7 Oligonucleótidos iniciadores, mistura de reacção e condições de PCR utilizadas na pesquisa da deleção a 3' do agrupamento génico β -globina

Oligonucleótidos Iniciadores		Tm	Mistura de reacção (volume final de 50mL)	μ L	Condições de PCR		
Directo	TGATGGCCTGGCTCACCTG	60,6 °C	Mistura 1	dNTPs	1,0	94°C, 2min	
				O. I. Directo (15pmol/mL)	1,0	94°C, 10s	10 Ciclos
				O. I. Reverso (15pmol/mL)	1,0	64°C, 30s	
				H ₂ O bidestilada	21,0	68°C, 4min	
Reverso	AGATCTACTCTCGGCCAGGCC	60,6 °C	Mistura 2	DNA molde	2,0	94°C, 15s	
				Tampão da Enzima	5,0	64°C, 30s	20 Ciclos
				Enzima	0,75	68°C, 4min + 20s	
				H ₂ O bidestilada	18,25	68°C, 7min	

Anexo B Determinação do haplótipo do agrupamento génico β -globina

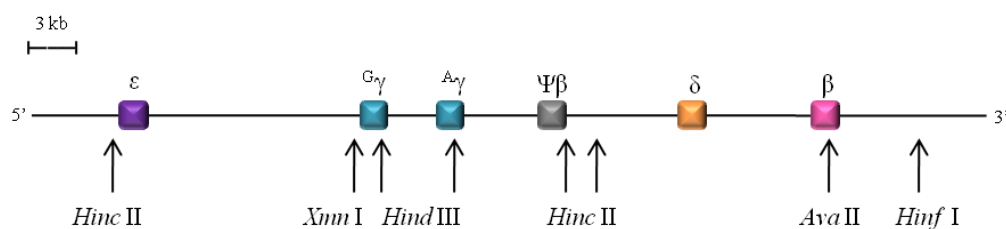


Figura B. 1. Esquema representativo do agrupamento génico β -globina e localização dos RFLPs analisados para a construção do haplótipo.

Tabela B. 1 Principais haplótipos encontrados na região do Mediterrâneo

Haplótipos Mediterrâneos	<i>Hinc</i> II	<i>Hind</i> III	<i>Hind</i> III	<i>Hinc</i> II	<i>Hinc</i> II	<i>Ava</i> II	<i>Hinf</i> I
I	+	-	-	-	-	+	+
II	-	+	+	-	+	+	+
III	-	+	-	+	+	+	-
IV	-	+	-	+	+	-	+
V	+	-	-	-	-	+	-
VI	-	+	+	-	-	-	+
VII	+	-	-	-	-	-	+
VIII	-	+	-	+	-	+	-
IX	-	+	-	+	+	+	+

Tabela B. 2. Oligonucleótidos iniciadores, T_m , condições da reacção de ligação e de extensão de cada polimorfismo

Polimorfismo	Oligonucleótidos Iniciadores	T_m °C	Condições da reacção de ligação (A)	Condições da reacção de extensão (B)
<i>Hinc</i> II (ϵ)	TTAAGAGAGCTAGAACTGGGTGAG	55,6	58°C, 1min	72°C, 1min
	AAGCCTCATATAAAGGAGCAAATC	53,1		
<i>Xmn</i> I ($G\gamma$)	GCACTGAAACTGTTGCTTTATAGGAT	55,7	55°C, 1min	72°C, 1min
	TGGCGTCTGGACTAGGAGCTTATT	59,5		
<i>Hind</i> III ($G\gamma$)	AGTGCTGCAAGAAGAACAACACTACC	57,5	56°C, 1min	72°C, 1'30min
	CTGTGACCAGTCTGTAGACTTAAG	54,4		
<i>Hind</i> III ($A\gamma$)	GACTAGTGCTTGAAGGGGAACAAC	57,7	56°C, 1min	72°C, 1'30min
	CCTCTGCTGATTTCATTCTTACAC	53,8		
<i>Hinc</i> II (5' $\Psi\beta$)	TCCTATCCATTACTGTTTCCTTGAA	53,4	60°C, 1min	72°C, 1'30min
	TCCTATCCATTACTGTTTCCTTGAA	49,6		
<i>Hinc</i> II (3' $\Psi\beta$)	GTACTCATACTTTAAGTCCTAACT	49,5	60°C, 1min	72°C, 1min
	TAAGCAAGATTAATTTCTGGTCTCT	51,7		
<i>Ava</i> II (3' β)	ACTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGG	68,6	66°C, 1min	72°C, 1min
	TTCGTCTGTTTCCCATTCTAAACT	54,3		
<i>Hinf</i> I (3' β)	GGGCCTATGATAGGGTAAT	50,5	56°C, 1min	72°C, 1'30min
	TGGATTCTGCCTAATAAAA	45,9		

Tabela B. 3 Mistura de reacção, quantidade de reagente e condições de PCR

Mistura de reacção (volume final de 50mL)	µL	Condições de PCR	
Tampão de PCR	5,0	94°C, 5min	
BSA (10m/mL)	0,7		
dNTPs	1,0	94°C, 1min	30 Ciclos
O. I. Directo (25pmol/mL)	1,0		
O. I. Reverso (25pmol/ml)	1,0	B	
Taq Polimerase (5U/µL)	0,2	72°C, 10min	
H ₂ O bidestilada	40,1		
DNA molde	1,0		

A- Condições da reacção de ligação; B- Condições da reacção de extensão.
Ver tabela B. 2.

Tabela B. 4 Tamanho dos fragmentos de DNA após a digestão enzimática

		<i>Hinc</i> II (ε)	<i>Xmn</i> I (^G γ)	<i>Hind</i> III (^G γ)	<i>Hind</i> III (^A γ)	<i>Hinc</i> II (5'Ψβ)	<i>Hinc</i> II (3'Ψβ)	<i>Ava</i> II (3'β)	<i>Hinf</i> I (3'β)
Tamanho do fragmento (pb)	Não digerido	158	677	788 274	776 228	794	914	315 361	341 244 154
	Digerido	86 72	462 215	697 91 274	681 95 228	687 107	480 434	214 101 361	213 128 244 154

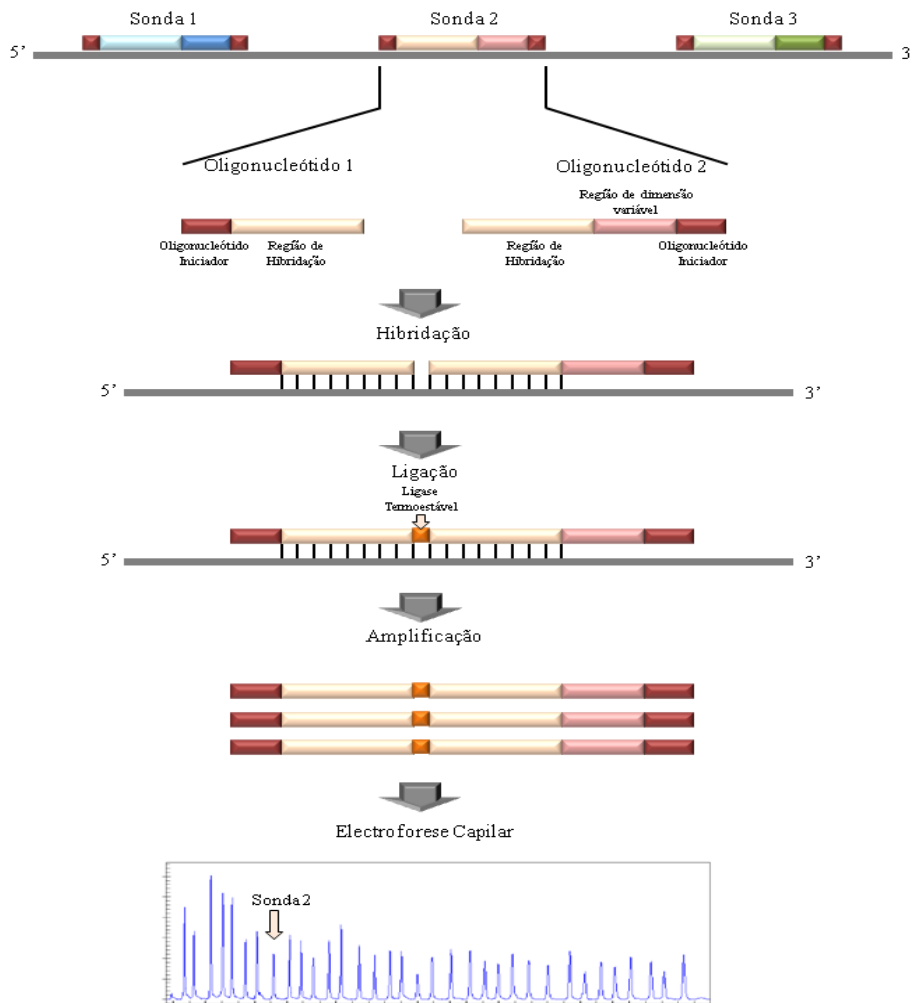


Figura B. 2. Esquema da metodologia de MLPA. (Adaptado de www.mlpa.com)

Anexo C Ensaios controlo para MLPA

Controlos Normais

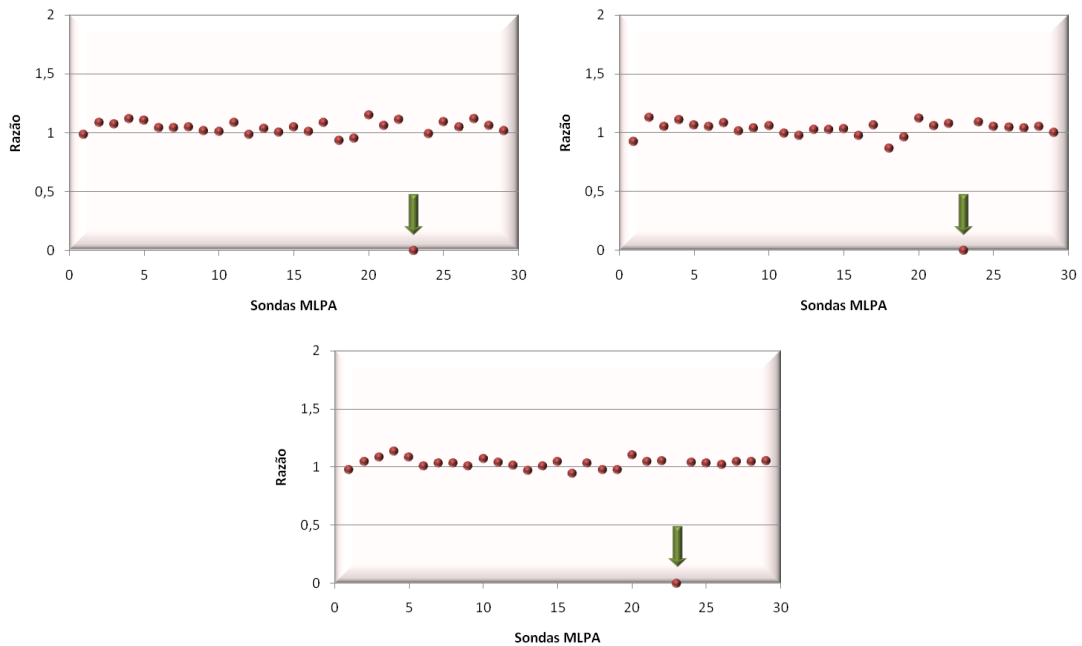


Figura C. 1. Ensaios controlo para a implementação da metodologia de MLPA no estudo do agrupamento génico β -globina. Perfil de amplificação das sondas MLPA de três indivíduos normais. A sonda n°23 [↓] só amplifica na presença da mutação drepanocítica.

Controlos Positivos

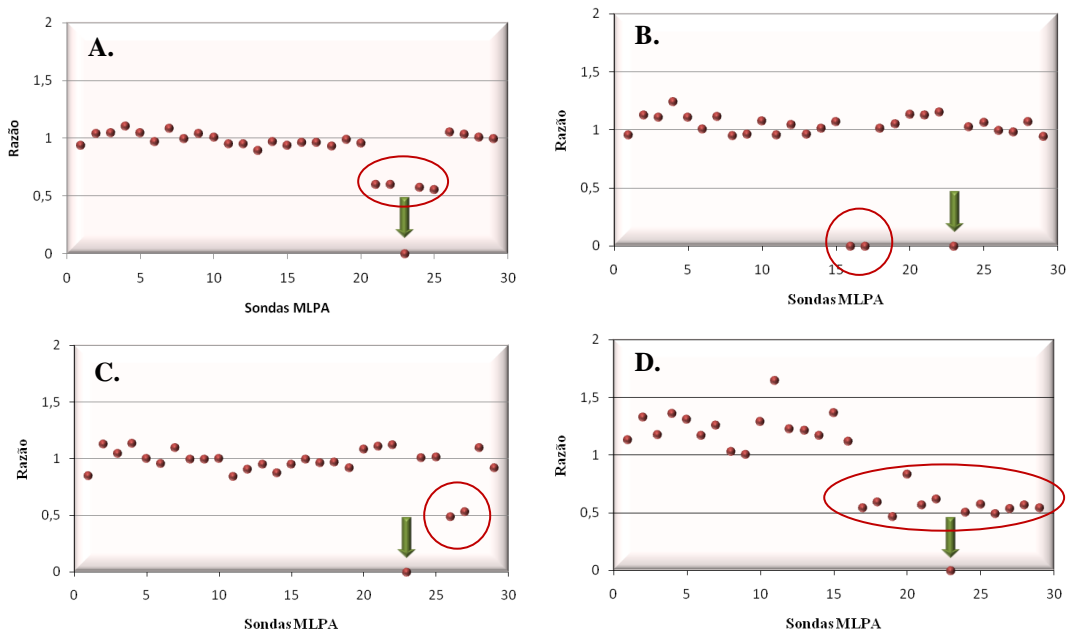


Figura C. 2. Ensaios controlo para a implementação da metodologia de MLPA no estudo do agrupamento génico β -globina. Perfil de amplificação das sondas MLPA de quatro indivíduos portadores de deleções conhecidas. **A.** Perfil de amplificação característica da deleção 1393pb em heterozigotia. **B.** Perfil de amplificação característica da deleção Corfu em homozigotia. **C.** Perfil de amplificação característica da deleção Indiana em heterozigotia. **D.** Perfil de amplificação característica da deleção Spanish em heterozigotia. A sonda n°23 [↓] apenas amplifica na presença da mutação drepanocítica.

