

DIAGNÓSTICO DA HEMOGLOBINOPATIA DE LEPORE POR ANÁLISE DO DNA

JOÃO LAVINHA, VÂNIA SAMPAIO, EDUARDO DA MATA

Laboratório de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde. Serviços de Patologia Clínica e Medicina III. Hospital de-Pulido Valente. Lisboa.

RESUMO

Os autores ilustram a aplicação das metodologias do DNA recombinante (em particular o *Southern blotting*) ao diagnóstico genotípico da hemoglobinopatia de Lepore Boston. A utilização das endonucleases de restrição PstI e XbaI e de uma sonda molecular específica do gene da β globina permite pôr em evidência a deleção de aproximadamente 7kb típica do gene $\delta\beta^{Boston}$. É discutido o impacto deste tipo de métodos no diagnóstico pré-natal das hemoglobinopatias *major*.

SUMMARY

Diagnosis of Lepore haemoglobinopathy through DNA testing

We illustrate the application of recombinant DNA methods (namely Southern blotting) for the genotypic diagnosis of haemoglobin Lepore Boston: the use of the restriction endonucleases PstI and XbaI along with a β globin gene specific probe make it possible to detect a deletion of approximately 7kb which typically characterizes the $\delta\beta^{Boston}$ gene. The impact of using such methods in the prenatal diagnosis of major haemoglobinopathies is discussed.

INTRODUÇÃO

A hemoglobinopatia de Lepore, no estado homocigótico ou em associação com o traço β talassémico ou drepanocítico (Hb S), manifesta-se, respectivamente, por um quadro clínico de talassémia *major* ou talassodrepanocitose. O estado heterocigótico é assintomático (*talassémia minor*)¹. O estudo epidemiológico das hemoglobinopatias na população portuguesa revelou a existência de portadores de Hb Lepore nos distritos de Vila Real, Porto, Viseu (0,12%), Coimbra, Santarém (0,50%), Lisboa e Faro (M C Martins, comunicação pessoal).

O gene globínico anómalo, que controla a síntese da cadeia não- α da Hb Lepore, resulta da fusão dos genes δ e β globina em consequência de um *crossover* desigual entre os dois cromossomas 11 homólogos de que resulta uma deleção de aproximadamente 7 quilobases (kb) (para revisão consultar a ref 2): no caso da Hb Lepore mais comum (Hb Lepore Boston) o ponto de quebra situa-se numa região de homologia entre os genes δ e β na vizinhança da junção entre o exão 2 e o intrão 2³. Assim, o gene recombinante $\delta\beta^{Boston}$ contém o promotor, os exões 1 e 2 e o intrão 1 do gene δ , enquanto o intrão 2, o exão 3 e a região de flanco a jusante provêm do gene β (Fig 1).

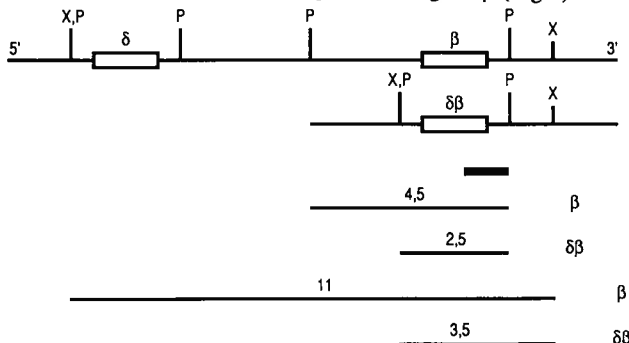


Fig. 1 - Análise do DNA com endonucleases de restrição e *Southern blotting*. Mapa de restrição da região dos genes δ e β globina para as endonucleases PstI (P) e XbaI (X) nas configurações normal (β) e Lepore ($\delta\beta$). Os comprimentos dos fragmentos de restrição estão expressos em quilobases (kb). O retângulo a negro indica a posição da sonda molecular utilizada neste estudo: um fragmento de DNA com 1,2kb com extremidades EcoRI (5') e PstI (3').

Recebido para publicação: 13 de Fevereiro de 1992

A demonstração da presença da Hb Lepore nos eritrócitos periféricos faz-se por rotina através da separação electroforética das hemoglobinas sobre acetato de celulose a pH alcalino. No entanto, este método carece de especificidade pois foram descritas várias outras hemoglobinas anormais que, à luz dos critérios de Schneider & Barwick⁴, migram «como Lepore»: Alabama, D-Ibadan, D-Iran, D-Korle Bu, D-Los Angeles, G-Accra, G-Galveston, G-Philadelphia, G-Saskaton Cousha, Hasharon, Mobile, Okaloosa, Russ, S, Vancouver, etc. É certo que a observação dos índices hematimétricos e da abundância relativa da hemoglobina variante permitirá excluir muitas daquelas hemoglobinas como sendo Hb Lepore (isto é, a fusão dos genes δ e β globina) uma vez que esta está associada a uma discreta hipocromia e microcitose e se encontra numa proporção situada tipicamente entre 7 e 13%. No entanto, o conhecimento do defeito molecular que está na base da produção da Hb Lepore permite conceber um método de confirmação do diagnóstico por análise directa do DNA³.

Neste estudo, que visava ilustrar as aplicações da tecnologia do DNA recombinante ao diagnóstico de doenças genéticas, a análise molecular permitiu confirmar o diagnóstico hematológico de portador de Hb Lepore numa mulher com litíase vesicular e seus familiares.

MATERIAL E MÉTODOS

A. Indivíduos estudados: A necessidade deste estudo foi sugerida aquando da avaliação pré-operatória para colecistectomia de uma mulher caucasiana com 40 anos que apresentava Murphy vesicular positivo e, ao exame ecográfico, litíase vesicular. As anomalias observadas nos índices hematimétricos e na morfologia eritrocitária motivaram a realização da electroforese de hemoglobinas na paciente. Posteriormente uma investigação hematológica semelhante foi efectuada nos progenitores, nos filhos e no marido (Fig 2).

B. Estudo hematológico: Hemograma (índices hematimétricos, obtidos num contador automático de células, e morfologia dos eritrócitos). Contagem de reticulócitos. Doseamento do ferro sérico e determinação da capacidade total de fixação do ferro. Electroforese das hemoglobinas em acetato de celulose a pH=8,4 seguida da avaliação densitométrica das fracções. Doseamento da Hb A2 após separação por cromatografia em coluna de DEAE-celulose. Prova de falciformação. Estudo da resistência globular (imediate e após 24 horas).

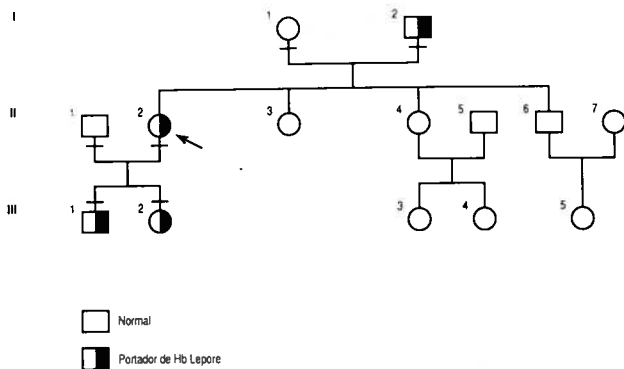


Fig. 2 - Árvore genealógica da família com Hb Lepore que foi objecto deste estudo. Os indivíduos examinados estão assinalados com um traço (-). A paciente está indicada com uma seta (→).

C. Estudo molecular: O DNA genómico total foi isolado dos linfócitos periféricos a partir de 10 ml de sangue colhido em EDTA⁵, digerido com as endonucleases de restrição PstI e XbaI nas condições especificadas pelo fabricante, tendo os fragmentos resultantes sido analisados pelo método de Southern⁶ com uma sonda molecular correspondente à região 3' do gene da β globina, marcada com ³²P por extensão múltipla com iniciador⁷.

RESULTADOS

Na sequência de uma avaliação pré-operatória para colecistectomia, foi detectada na paciente uma hemoglobina anormal migrando «como Lepore» no estado heterozigótico. Este achado motivou a realização de um estudo familiar com vista a elucidar o estado de portador da hemoglobinopatia de Lepore no marido, nos progenitores e nos filhos. Os resultados dos estudos hematológicos estão sumarizados no Quadro 1.

QUADRO 1 - Resultados do estudo hematológico com vista à detecção de portadores de Hb Lepore ou outra hemoglobinopatia

Indivíduo	GV	Hb	Retics	VGM	HGM	Hb Lepore	Hb A2	RG
I1	4,6	13,0	4	85	29	-	N	N
I2	6,0	14,8	5	72	25	16	N	N
III1	4,7	14,0	n.d.	94	30	n.d.	n.d.	n.d.
II2	6,1	11,7	n.d.	60	19	12	N	N
III1	5,9	12,9	n.d.	68	22	10	N	N
III2	5,6	11,3	13	64	21	12	2 ^c	N

GV=glóbulos vermelhos ($10^{12}/l$), Retics=reticulócitos ($^{\circ}/\infty$), VGM=volume globular médio (fl), HGM=hemoglobina globular média (pg), RG=resistência globular, N=normal, n.d.=não determinado, c=quantificado após separação por cromatografia em coluna de DEAE-celulose. A abundância relativa das frações da hemoglobina está expressa em percentagem.

Típicos portadores de Hb Lepore, os indivíduos I2, II2, III1 e III2 apresentam uma discreta anemia microcítica e hipocrômica com valores normais de Hb A2 e sem alteração da resistência globular. O exame do esfregaço de sangue periférico revelou accentuada anisocitose, anisocromia, esquizocitose e poiquilocitose. A contribuição da hemoglobina Lepore para a hemoglobina total varia entre 10 e 16%. Na Fig 1 o mapa de restrição (para as enzimas PstI e XbaI) da região dos genes da δ e da β globina num cromossoma normal é confrontado com o da mesma

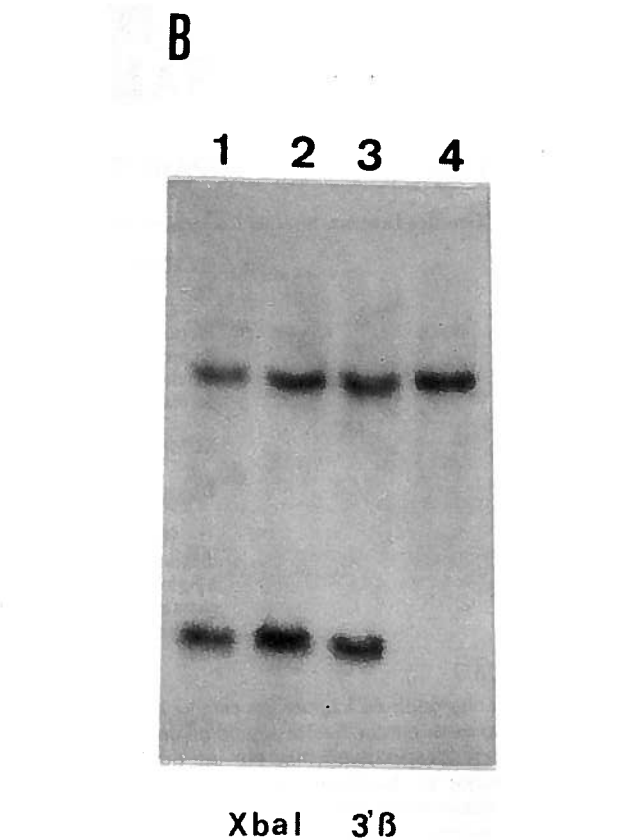


Fig. 3 - Visualização da deleção de aproximadamente 7kb associada ao gene híbrido $\delta\beta$ Boston através da digestão com XbaI e hibridação com a sonda definida acima: heterozigoto para Hb Lepore - controlo positivo (canal 1), II2 (canal 2), III2 (canal 3) e homozigoto normal - controlo negativo (canal 4).

região num cromossoma $\delta\beta$ Lepore Boston. E', pois, de esperar que, para além dos fragmentos de 4,5kb (PstI) e 11kb (XbaI) correspondentes à configuração normal, os portadores de Hb Lepore apresentem fragmentos adicionais de 2,5kb e 3,5kb, respectivamente. De facto, foi observado esse padrão de fragmentos de restrição típico da heterozigotia para Hb Lepore na paciente (II2) e num dos filhos (III2) (Fig 3).

A identidade da hemoglobina anormal observada nos indivíduos I2 e III1 foi inferida a partir dos achados nos dois

familiares analisados a nível molecular. Com efeito, tendo sido demonstrado o carácter familiar da deleção de 7kb, é possível afirmar, sem ambiguidade, que, nos restantes elementos da família portadores de uma hemoglobina de mobilidade anormal, aquela deleção também está presente, dando origem à produção de Hb Lepore.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo ilustram a forma como, após a introdução das metodologias do DNA recombinante na medicina humana^{8,9}, se pode fazer o diagnóstico genotípico de uma doença genética (ou, neste caso, do seu estado de portador). De facto um crescente número de patologias são já hoje abordáveis de uma perspectiva «molecular»¹⁰. Em termos de uma prevenção das doenças monogénicas baseada na detecção de portadores, no aconselhamento genético e no diagnóstico pré-natal, ela é já correntemente proposta no nosso País aos casais em risco de hemoglobinopatia, hemofilia, fibrose quística ou distrofia muscular de Duchenne¹¹⁻¹⁴. A este respeito está a ser particularmente bem sucedido o programa da Organização Mundial da Saúde para a prevenção das hemoglobinopatias (entre as quais a relativamente pouco frequente hemoglobinopatia de Lepore) na região mediterrânica¹⁵.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a J.P. Silva a sua excelente assistência técnica.

BIBLIOGRAFIA

1. WEATHERALL D.J., CLEGG J.B.: The thalassaemia syndromes. 3ª Edição, Oxford, Blackwell Sci Publ, 1981; 397-427.
2. EFREMOY G.D.: Hemoglobin Lepore and anti-Lepore. *Hemoglobin* 1978; 2: 197.
3. MAYILIO F., GIAMPAOLO A., CARÉ A., SPOSINI M., MARINNUCI M.: The δ - β crossover region in Lepore Boston hemoglobinopathy is restricted to a 59 base pairs region around the 5' splice junction of the large globin gene intervening sequence. *Blood* 1983; 62: 230-233.
4. SCHNEIDER R.G., BARWICK R.C.: Measuring electrophoretic mobilities of mutant hemoglobins and globin chains. *Hemoglobin* 1978; 2: 417-435.
5. GROSS-BELLARD M., OUDET P., CHAMBON P.: Isolation of high molecular weight DNA from mammalian cells. *Eur J Biochem* 1973; 36: 32-38.
6. SOUTHERN E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Molec Biol* 1975; 98: 503-519.
7. FEINBERG A.P., VOGELSTEIN B.: A new technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983; 132: 6-13.
8. KAN Y.W., GOLBUS M.S., DOZY A.M.: Prenatal diagnosis of δ thalassaemia: clinical application of molecular hybridization. *N Eng J Med* 1976; 295: 1165-1167.
9. KAN Y.W., DOZY A.M.: Polymorphism of DNA sequence adjacent to the human β globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 5631 - 5635.
10. COOPER D.N., SCHMIDTKE J.: *Diagnosis of genetic disease using recombinant DNA*. Second edition. *Hum Genet* 1989; 83: 307-334.
11. FAUSTINO P., OSÓRIO-ALMEIDA L., BARBOT J., ESPÍRITO-SANTO D., GONÇALVES J., ROMÃO L., MARTINS M.C., MARQUES M.M., Lavinha J.: Novel promoter and splice junction defects add to the genetic, clinical or geographic heterogeneity of β thalassaemia in the Portuguese population. *Hum Genet* 1992; no prelo.
12. DAVID D., CAPUCHO I., QUINTAS I., FELÍO M.J., DINIZ M.J., MATOS P., CAMPOS M., LAVINHA J.: Dois anos de detecção de portadores e diagnóstico pré-natal de hemofilia A em Portugal, baseado na análise do DNA. V. Simpósio de Hematologia. Coimbra 1990.
13. DUARTE A., BARRETO C., MARQUES-PINTO L., TAVARES M.C., AMIL J., PINTO M., CHIEIRA M.L., CASTEDO S., LAVINHA J.: Cystic fibrosis in the Portuguese population: haplotype distribution and molecular pathology. *Hum Genet* 1990; 85: 404-405.
14. SARAIVA J.M., LAVINHA J., FINEZA I., SANTOS H.G.: Aconselhamento genético de famílias com distrofia muscular de Duchenne. *Coimbra Médica* 1990; 11: 97-101.
15. CAO A.: Results of programmes for antenatal detection of thalassaemia in reducing the incidence of the disorder. *Blood Rev* 1987; 1: 169-176.