

BROTÉRIA GENÉTICA

REVISTA QUADRIMESTRAL

ÓRGÃO DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA

TEMAS EM FOCO

A alimentação do mundo no próximo século — 1.ª edição —
por *F. Mollin-Saunpape*

ARTIGOS GERAIS E DE REVISÃO

CONSELHO DE REDACÇÃO

Subsidiada pela
**Junta Nacional de Investigação Científica
e Tecnológica**

ADMINISTRADOR: Instituto Gulbenkian de Ciência
CONDICÕES DE ASSINATURA PARA 1995

Portugal: Esc. 1.200500 (colocada gratuitamente pela Sociedade Portuguesa de Genética nos seus sêdes)
Outros Países: Esc. 2170
Número volume: Esc. 602200

REDACÇÃO E ADMINISTRAÇÃO

BROTÉRIA GENÉTICA
Rua Mestre António Taborda, 14
1203 LISBOA CODEX
Télex: 308 18 60
Fax: 392 68 39



ÓRGÃO DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA

CONSELHO DE REDACÇÃO:

Prof. Dr. Luís Archer (Director)
Cristina Marinho (Secretária)
Prof. Dr. Jorge Antunes-Correia
Prof. Dr. Miguel Pereira Coutinho
Eng.º Tristão Mello-Sampayo
Prof. Dr. Luís Sieuve Monteiro
Prof. Dr. Amândio S. Tavares

ADMINISTRADOR: Januário Geraldes

CONDIÇÕES DE ASSINATURA PARA 1995

Portugal: Esc. 1.500\$00 (oferecida gratuitamente pela Sociedade Portuguesa de Genética aos seus sócios)

Outros Países: Dol. \$17.0

Número avulso: Esc. 600\$00

REDACÇÃO E ADMINISTRAÇÃO

BROTÉRIA GENÉTICA
Rua Maestro António Taborda, 14
1293 LISBOA CODEX
Telef.. 396 16 60
Fax: 395 66 29

Comp. e Imp. — Gabinete Comercial Gráfico, Lda.
Rua dos Duques de Bragança, 6 — 1200 LISBOA
Depósito Legal n.º 90369/95

A ALIMENTAÇÃO DO MUNDO NO PRÓXIMO SÉCULO

I — INTRODUÇÃO

ÍNDICE

(Instituto Nacional de Melhoramento de Plantas, Elyria)

A população mundial é actualmente da cerca de 5 biliões de pessoas e irá passar para a segunda metade do próximo século. Isto significa que não há possibilidade, e não o será no futuro próximo, conter o crescimento da população humana.

TEMAS EM FOCO

- A alimentação do mundo no próximo século. I — Introdução 97
por *T. Mello-Sampayo*

ARTIGOS GERAIS E DE REVISÃO

- A alimentação do mundo no próximo século. II — A situação da agricultura no Sudoeste Asiático e nos países menos desenvolvidos 99
por *M. S. Swaminathan*

- A alimentação do mundo no próximo século. III — Progressos da Biologia Molecular 111
por *Richard Flavell*

- Expressão dos Genes do agrupamento da α -Globina Humana 123
por *Lulsa Romão*

Índice dos volumes XIII-XVI (1992-1995)

- A. Índice por Assuntos 169
B. Índice por Autores 175

A ALIMENTAÇÃO DO MUNDO NO PRÓXIMO SÉCULO I — INTRODUÇÃO

T. MELLO-SAMPAYO

(Estação Nacional de Melhoramento de Plantas, Elvas)

A população mundial é actualmente de cerca de 5 biliões de pessoas e calcula-se que duplicará na segunda metade do próximo século. Isto significa que não foi possível, e não o será em futuro próximo, conter o crescimento demográfico explosivo da humanidade. Este crescimento situa-se sobretudo nos estratos mais pobres e carenciados que constituem mais de dois terços dos habitantes do planeta, os quais se localizam principalmente na Ásia, na África e na América Latina.

Entre as razões de fundo que presidem a este estado de coisas, distingue-se a falta de educação e de formação profissional nos países menos desenvolvidos, as quais impedem que cada ser humano em dificuldade, seja capaz de obter, de imediato e por meios legais apropriados, os produtos alimentares exóticos excedentários de que necessita e de adquirir a médio e a longo prazo os conhecimentos e o apoio científico indispensáveis para aumentar o seu poder de compra e a sua capacidade de produção local acrescentada. por seu turno, aumenta de forma incontida a falta de cultura das populações dos países desenvolvidos a qual se tornou vítima dum racionalismo económico acentuado e isolacionista, o qual é por sua vez, fruto e instrumento duma tecnocracia extreme, desumana, da qual os valores humanísticos foram abolidos, por se terem tornado um estorvo ao consumismo egoísta e esterilizante.

Portugal converteu-se, no último decénio, rapidamente e no papel, num país desenvolvido, por virtude da sua integração na CEE, actual União Europeia. Mas o país enferma, no entanto, duma situação singular de deficitário alimentar de facto, mas de excedentário, por acordo de adesão. Para exemplificar esta curiosa contradição, registe-se que muitos agricultores do nosso país estão neste momento a desmobilizar as suas explorações agrícolas, com prejuízo, muitas vezes das suas potencialidades de maior produtividade, a troco de subsídios desincentivadores, extraídos de verbas estruturais cedidas a fundo perdido. Isto constitui, por si mesmo, uma situação degradante para o próprio agricultor que se sente desactivado e mandado para casa. podem no entanto e deste modo os portugueses adquirir mais barato os bens alimentares produzidos em excesso

pelos seus aliados europeus. Presume-se que assim aqueles fundos perdidos tenham sido reencontrados, regressando aos bolsos daqueles que nos emprestaram. Curiosas virtualidades mágicas dos fundos estruturais europeus.

O Banco Mundial calcula que, para alimentar toda a população do mundo, dentro de três décadas, teremos de produzir, só em grão alimentar, cerca do dobro do que é produzido actualmente. As perspectivas são também de que não haverá, dentro de pouco tempo, excedentes alimentares de fácil obtenção, devido a consideráveis pressões de desaceleração da cultura que estão a ser exercidas em todos os países ocidentais. Daí se conclui que o nosso país estará em breve a braços com problemas de importação alimentar, agravados do desmantelamento das suas estruturas produtivas, este último, displicentemente ditado pelos homens sem rosto do Norte-Centro da Europa, eficientemente acolitados pelos infalibilistas, herméticos, transnacionais e incultos das comunidades locais.

A desaceleração da produção agrícola tem sido acompanhada, como é natural, do enfraquecimento ou simples eliminação das estações experimentais de melhoramento de plantas. Algumas destas estações, como era o caso do famoso Plant Breeding Institute em Cambridge, executavam trabalho de pesquisa, relevante não só para o próprio país como também para muitos países do terceiro mundo com os quais colaborava na investigação científica e no recrutamento e preparação de pessoal especializado. O atraso dos países do terceiro mundo, incapazes de criar isoladamente os seus próprios quadros, saiu assim significativamente reforçado. Em Portugal, porque vamos sempre na cauda, a destruição vai ainda a caminho, mas, ultimamente, a passo acelerado.

A tecnologia científica tem vindo ultimamente a concentrar-se acentuadamente nas Universidades. Para estas tem vindo a convergir recursos e suporte financeiro de grandes empresas com fins lucrativos. O alerta tem sido lançado por vários cientistas contra eventuais perigos desta intrusão nas funções universitárias essenciais, no domínio do ensino e da investigação básica.

E as grandes realizações científicas, nas suas aplicações no Melhoramento de Plantas já estão aí à vista e a despontar em força, conforme a descrição de dois cientistas de renome mundial, os Profs. Drs. M. S. Swaminathan e Richard Flavel cujo depoimento tive a felicidade de ouvir e de recolher em cassette áudio por ocasião do 17.º Congresso Internacional de Genética, realizado em Birmingham, em meados de Agosto de 1993. As duas conferências foram convertidas por mim para português e são publicadas a seguir com os sub-títulos que adequadamente lhes conferi. O Dr. Swaminathan é o Director do Centro de Agricultura Sustentável sediado em Madrasta e o Dr. Flavell é o actual Director do John Innes Centre for Plant Science Research, Norwich.

A ALIMENTAÇÃO DO MUNDO NO PRÓXIMO SÉCULO II — A SITUAÇÃO DA AGRICULTURA NO SUDOESTE ASIÁTICO E NOS PAÍSES MENOS DESENVOLVIDOS

M. S. SWAMINATHAN

(Center for Sustainable Agriculture and Rural Development, Madras)

Ao começar esta discussão sobre «A alimentação do Mundo no próximo Século», será útil lembrar que esta noite cerca de 7 milhões de crianças, mulheres e homens irão para a cama com fome. Quando digo com fome incluo cerca de 200 milhões ou mais de crianças subnutridas ou inadequadamente alimentadas, de acordo com o Congresso Alimentar realizado em Roma, em Dezembro passado. De modo que mesmo hoje temos o problema da fome endémica. E não estou a referir-me acerca da Somália ou outro problema de fome induzido pelo homem. Falo apenas de fome endémica e de subnutrição.

Nos últimos 2 dias falámos em vários aniversários: 28.^o aniversário de Watson e Crick, 10.^o aniversário da 1.^a planta transgénica. Mas também está decorrendo em 1993 o 23.^o aniversário da cunhagem do termo «Revolução Verde». Foi em 1968 que o Dr. William Guard do USDA cunhou este termo com o propósito de indicar duma forma dramática o que ele pensou estar acontecendo essencialmente naquele momento em trigo, na Índia e no Paquistão. Em ambos os países se obtivera uma considerável colheita num salto quantitativo, em termos de produção total, em relação à melhor colheita anterior. Assim, a palavra «Revolução Verde» fora cunhada e tornou-se parte da literatura contemporânea. O impacto deste género de «Revolução Verde» é o que eu poderia dizer, agricultura de poupança de terra. Actualmente o mundo é um todo, aproximadamente 400 milhões de famílias de agricultores existem. Se se considerar cinco pessoas por família são cerca de 2 biliões, dos 15 biliões já mencionados por Sir Ralph Riley, que estão envolvidos em actividades primárias de agricultura. Destes 400 milhões de famílias, cerca de 100 milhões estão na Índia e outros 100 milhões na China. Índia e China têm assim metade das famílias agrícolas do mundo. A maioria destas famílias são detentoras de muito pequenas áreas: cerca de 1 ha ou menos, na maioria dos casos. E obviamente sob tão precárias condições a única maneira que têm de obter um pouco mais de ganho em excedentes agrícolas é através de mais elevada produtividade. De forma que a «Revolução Verde» é um caminho pelo qual através da melhor utilização da água disponível e da gestão da fertilidade do solo, foi possível

aumentar a produtividade e Sir Ralph mencionou que é o único caminho disponível no futuro.

Ao considerar a Índia como exemplo, em 1964/65, o melhor ano de produção antes do advento das variedades novas de trigo, semi-anãs, não acamáveis, originalmente do México, do Centro Internacional de Melhoramentos de Milho e Trigo (CIMMYT) e obtidas do trabalho executado sob a direcção do Dr. Norman Borloug, verificámos que por essa altura havia 13,4 milhões de hectares produzindo cerca de 12 milhões de toneladas. A produtividade média era de menos de uma tonelada por hectare. Há três anos atrás havia 24 milhões de hectares com 25 milhões de toneladas. Este ano havia cerca de 56 milhões de toneladas a partir de 23/23,5 milhões de hectares. Podemos assim visualizar aquilo que poderia ter acontecido se esta forma de melhoramentos da produtividade não tivesse ocorrido. Teriam sido necessários quase 55 milhões de hectares para produzir 55 milhões de toneladas de trigo.

É por esta razão que se lhe chama «agricultura de poupança de terra» considerando o facto de que entre 1950 e cerca do ano 2000 a área de terra arável disponível por capita no mundo, irá no conjunto baixar para 40% da actual.

O significado de melhorar a produtividade por unidade de terra e unidade de tempo é óbvia. Esta particular Revolução não podia ter ocorrido em melhor oportunidade porque os meados do anos 50 e começo dos 60 apareceram previsões alarmantes. O agrónomo americano William Paddock tinha previsto em 1970 o começo duma fome extensiva como resultado do desajustamento da habilidade produtiva americana e canadiana (do chamado «Cesto de Pão») para ir ao encontro das necessidades de crescimento dos países em desenvolvimento.

Paddock tinha dito que após 1974 não seria possível para os países industrializados responderem às necessidades dos países em desenvolvimento e o US Department of Agriculture baseado nessa previsão tinha adiado essa catástrofe por 10 anos. Mas actualmente o Mundo está a alimentar acima de 5 biliões de pessoas, há fome crónica e endémica mas largamente devido ao baixo poder de aquisição a que me referirei mais tarde.

Esta revolução foi devida a mudanças na arquitectura genética das plantas. O que realmente aconteceu foi que existiam mutantes em trigo Norin 10 do Japão e no arroz (o gene ananizante de origem DG da China), que conferiram um porte curto e erecto. As plantas ficaram com a maior parte da fotossíntese localizada no grão em vez de na palha e noutras partes. No que designamos por «index de colheita» (harvest index) a função fotossintética se localizou progressivamente mais nos grãos. Elas são quase que « máquinas produtoras de grão» como as poderemos designar. Com a condição de que também tivessem propriedades de resistência e que houvesse boa gestão da fertilidade do solo

e da água, estas plantas deram elevadas produções, 3 a 4 vezes maiores do que as das variedades anteriores. Isto apoderou-se da imaginação dos agricultores. Por exemplo na Índia, de cerca de 4 hectares de arroz anão em 1963/4, a área aumentou para 4 milhões de hectares de cultura de trigos anão em 1970/71 quando o país constituiu um reserva de cerca de 10 milhões de toneladas de grão. Estas variedades eram também relativamente insensíveis ao fotoperiodismo. Em outras palavras eram flexíveis e ajustáveis em termos de sementeira. Nós estávamos nos Trópicos onde temos sol abundante durante o ano e água disponível para termos 2-3 colheitas por ano. E vimos desde os primeiros dias da aplicação da Genética que desde a selecção de linhas puras a partir de hibridação simples ao novo tipo de plantas, a introdução de esterilidade masculina e do híbrido com heterosis e finalmente uma combinação do novo tipo de plantas com o vigor híbrido, tudo isto nos habilitava a prosseguir na elevação do tecto de produtividade, gradualmente, de cerca de 2 toneladas em 1930, até cerca de 12 toneladas na actualidade. Verificou-se assim um melhoramento gradual em produtividade. Tudo isto envolveu passos importantes em termos de melhoramento de plantas, usando diferentes princípios genéticos e também a vasta gama de recursos de material genético.

A China foi a primeira a introduzir arroz híbrido. Efectivamente isto foi sempre um sonho dos melhoradores de plantas. Quando eu era estudante em Cambridge, nos começos dos anos 50, as pessoas costumavam dizer que quando fôssemos capazes de produzir plantas de polinização cruzada a partir de plantas de autofecundação, nós abriríamos novos caminhos em produtividade. Os Chineses conseguiram isto no arroz pela introdução de linhas, com esterilidade masculina citoplasmática da Ilha de Hainan. E os Chineses são agora capazes de produzir quantidades consideráveis de sementes híbridas de F1 para cultivar. Cerca de 17 milhões de hectares num total de 30 milhões são agora de arroz híbrido, com 20% maior produtividade que a da melhor variedade anterior.

Para lhes dar uma ideia do desenvolvimento sequencial da aplicação de princípios genéticos no melhoramento do arroz, primeiro foi a mudança em arquitectura da planta, uma planta que pode utilizar nutrientes e água mais eficientemente. Então veio a mudança na resposta ao fotoperiodismo, tornando possível obter várias colheitas por ano desde que ouvesse água e exploração de vigor híbrido e heterosis. A cultura de anteras foi utilizada muito efectivamente como base para acelerar o melhoramento das plantas. E finalmente se está, actualmente, a trabalhar na introdução de genes para a apomixia, pela qual a semente da F1, se reproduz vegetativamente. De modo que não é necessário que o agricultor compre a semente todos os anos e poderá mantê-la e propagá-la. Verificou-se assim a introdução gradativa de princípios novos que não só aumentaram a produtividade como reduziram o custo da produção de semente. Ambos são importantes. Mas este é apenas um dos lados da história.

Dar-vos-ei não só uma imagem otimista em termos de melhoramentos da produção como também, e em correspondência, o conceito negativo de que quando o micro-ambiente da planta muda para o bem da planta ele também se modifica para o benefício dos patógenos e pragas. Em outras palavras a ecologia alterada do campo de trigo ou do arroz ou outro qualquer, além de produzir maiores produções também confere oportunidade para a multiplicação e crescimento de pragas e patógenos. Em 1965 éramos confrontados com um par de pragas ou doenças, mas em 90, 92 e 93 nós temos um crescente número de pragas e patógenos aos quais fazemos face. Esta é a razão porque a lição do Dr. R. Flavell será tão importante: como é que faremos face a esta situação. Teremos que reunir, nesta conjuntura um vasto aspecto de genes de uma vasta gama de origens de modo a obter resistência. Porque a semente é a melhor sede de segurança para os agricultores mais pobres em recursos. Se tivermos uma boa semente com um alargado espectro de tolerância ou resistência aos 'stress' bióticos e abióticos, então nós teremos custos de produção consideravelmente reduzidos. E será por isso que este tipo de melhoramento genético de variedades se torna tão importante. Em arroz, e graças ao Programa da Rockefeller Foundation sobre «biotecnologia de arroz», e em países em que estas técnicas novas tornam-se normalmente não disponíveis porque eles se encontram ainda por avançar na tecnologia biológica, companhias comerciais estão já envolvidas. Estas companhias procuram obviamente investimentos em termos comerciais e de vendas possíveis. Mais de 95% do arroz mundial é consumido pelas mesmas pessoas que o cultivam. Em outras palavras ele não é um artigo comercialmente importante e só 10 a 12 milhões de toneladas é que são comercializadas. E esta é a razão porque até à chegada da Fundação Rockefeller com um investimento a longo prazo em biotecnologia do arroz para a utilização da nova, moderna e melhor tecnologia em plantas, para busca de genes para lá das barreiras sexuais, não era possível obter o tipo de novas combinações genéticas iguais às que hoje são possíveis.

A completa série de espécies aparentadas com propriedades de resistência a uma completa gama de pragas e doenças: no passado, não era possível transferir genes a partir dessas espécies e era também muito difícil hibridá-las embora ocasionalmente, pela recuperação e activação embrionárias ('embryo rescue'), se se pudesse obter cruzamentos. Mas os híbridos eram estéreis e era muito difícil obter recombinantes que fossem úteis do ponto de vista do melhoramento da planta.

Neste momento temos em um número de combinações, material dessas espécies transferido para as cultivares comerciais. Isto tornou-se um 'boom' no melhoramento.

Mas a questão que surgiu sobre a Revolução Verde, era, do ponto de vista ecológico, a utilização em muitos casos de mais fertilizantes, mais pesticidas,

etc. E surgiram pragas resistentes a pesticidas, poluição níttrica da água do solo pelo uso exclusivo de fertilizantes e todos os problemas conhecidos. Quando se utilizam produtos químicos em quantidades excessivas surgem efeitos laterais ('side effects') como efeito de acção-reacção.

E em muitos casos a reacção não foi muito favorável. Então como produziremos aumentos da produtividade biológica sem prejudicar potenciais de produtividade futura, sem prejudicar as fundações ecológicas das quais a produção económica sustentável dependerá?

No que respeita ao arroz e controlo integrado de pragas, um dos mais importantes componentes da tecnologia é a variedade resistente. Todo o IPM ('integrated pest management') é construído em torno da linha resistente e a isto adicionamos muitas outras coisas como práticas culturais, não pulverização para não destruir os inimigos naturais das pragas, etc. Com efeito, algumas pragas do arroz como por exemplo o gafanhoto de planta castanha (brown plant hopper) são realmente multiplicadas pela aplicação dos pesticidas. Se utilizarmos pesticidas no cêdo eles eliminarão os inimigos naturais das pragas e estas não se propagam pelo campo. Por exemplo na Indonésia a produtividade cresceu e o custo de produção diminuiu e a defesa integrada contra as pragas têm progressivamente ganho terreno. Isto requereu, para adopção bem sucedida em condições de muita pequena propriedade, que todos os agricultores cooperassem. Se não quizerem cooperar é difícil de aplicar algumas das práticas ecologicamente válidas. Similarmente se alguém quer produzir uma tonelada de trigo requerem-se 25 quilogramas de azoto em áreas tropicais e sub-tropicais. Por outro lado para produzir 5 toneladas de arroz são necessários pelo menos 10 quilogramas de azoto. Ao compreendermos que a fertilidade média natural dos solos é apenas de 20 quilos, compreendemos também porque historicamente a produtividade média foi de apenas 1 tonelada durante tantos anos. Por várias centenas de anos este foi aproximadamente o que a produtividade do solo nativo podia suportar. Mas se se quiser produzir mais e ao mesmo tempo se não quiser utilizar fertilizantes qual será a alternativa? Aqui é outra vez onde a tecnologia moderna intervém através dos bio-fertilizantes quer eles sejam a Azola ou algas verde-azuis que cientistas franceses há alguns anos, cerca de 10, começaram a aplicar no Senegal, quer sejam pelas novas plantas fixadoras do azoto, ou seja a *Sesbania rostrata* a qual fixa azoto não só na rizosfera (raízes) como também no caule, produzindo nodulação do caule. Há muitas outras plantas deste tipo *Aeschynomene aspera*, por exemplo.

Neste tipo de plantas se pudermos induzir foto-insensibilidade podemos obter incorporação de 40-50 kg de N em cerca de 40-45 dias. Isto é, podemos gerar 2-3 toneladas de arroz a partir desse azoto através destas tecnologias. O Dr. James Peacock chamou-lhe «biological software» a esta crescente indústria particularmente quando corresponde a uma agricultura sustentável.

Já vos dei alguns exemplos de como restaurar a fertilidade do solo ou mantê-la a níveis razoáveis para produtividade elevada. Podemos também substituir pesticidas químicos por pesticidas botânicos e vários tipos de outros organismos. Podemos também utilizar inibidores de nitrificação para plantas, os quais, quando macerados, são um inibidor de nitrificação particularmente em condições de monção quando há chuvas torrenciais. Misturando ureia com esses inibidores somos capazes de retardar a libertação de azoto. Também a vermicultura se tornou proeminente outra vez e o melhoramento de novos «vermes do solo» está agora em progresso, adaptados a diferentes condições de solo, solos salinos, solos alcalinos, etc. Árvores e arbustos fixadores de azoto, outra vez, quer sejam ou não de sistema agroflorestal tornaram-se agora de comum introdução como árvores fixadoras de azoto em muitas culturas de plantações em jardins de 'coconote' e mesmo de cana de açúcar, etc. Assim, diferentes métodos de aplicação de sistemas alternativos de fertilidade e enriquecimento do solo e controle de pragas, estão-se desenvolvendo lentamente.

Outras vantagens destas indústrias de ganhos através de 'software' são que a maior parte delas substituem compras no mercado por 'inputs' de crescimento na propriedade agrícola. Deste modo os agricultores conservam os seus recursos na própria aldeia e podem assim criar-se indústrias subsidiárias. Algumas pessoas podem produzir o seu material e comercializá-lo.

Como há pouco Sir Ralph Riley disse vamos ter ao fim do século sérios problemas de alimentação. *Existe ainda actualmente no mundo uma despreocupação, porque existem ainda excedentes comerciáveis e os países industrializados estão confrontados com pesos de subsídios crescentes e portanto tem havido uma desaceleração de interesses em termos de produção alimentar. Extremamente perigoso! Porque precisávamos de acelerar a produção pelo menos de 3,5% por ano de modo a manter o passo em relação aos crescimento populacional e termos possibilidade de ultrapassar o problema de milhões de pessoas mal nutridas.*

No referente a problemas ecológico existe um número de áreas que hoje se tornavam importantes em termos de alimentar a população do século 21. Em primeiro lugar temos de considerar quatro categorias mais importantes de serviço na Biosfera: diversidade biológica (todos nós sabemos da diminuição progressiva do 'pool' génico, o qual está em perigo por variadas razões, e que a diversidade é a verdadeira base da engenharia genética, do moderno melhoramento de plantas, e que se não tivermos os genes não poderemos recombiná-los). A produtividade biológica não só depende da diversidade biológica. Como também do solo e água disponíveis particularmente da manutenção da fertilidade e saúde do solo e da qualidade e disponibilidade da água. No que respeita à regulação do clima e da radiação há hoje muitos modelos de simulação em computador em relação ao que possa suceder com variações térmicas, e res-

postas à radiação ultravioleta B de plantas e animais domésticos, crescendo vagorosamente. E acima de tudo, em termos de fertilidade de solo sobressai a acumulação crescente de resíduos tóxicos de várias origens: efluentes e também sempre as formas não bio-degradáveis. Muitas delas fazem perigar as fundações ecológicas para o avanço da agricultura sustentável. Repare-se para o solo a partir da Guerra Mundial II entre 1944 a 1990. Mais de 900 milhões de hectares de bom solo sofreram degradações de vários tipos. É esta a razão porque uma Convenção das Nações Unidas sobre a Desertificação está neste momento a ser negociada. Em outras palavras trata-se de saber como restaurar os potenciais biológicos dos solos. Todos os continentes são sofrendores e cerca de 10% a 12% de solo disponível sofreu degradação de vários tipos. Falo de degradação e não de desvio de solos agrícolas para finalidades não agrícolas. Com a crescente urbanização, comunicações e industrializações isto se vai também processando. No que se refere à água é ela um dos recursos importantes da nossa alimentação. Houve grandes esperanças mas muitos dos nossos oceanos têm sido explorados excessivamente. Segundo os dados disponíveis da FAO tem-se excedido em muitos casos a capacidade produtiva sustentável ou a pesca tem sido efectuada com captura de peixes muito jovens. Não se considerou no entanto a aquacultura. As estatísticas do ano passado dizem que 1009 centenas de milhões (100.900.000.000) de toneladas de grão alimentar foi produzido no mundo, a partir do solo, cerca de 110 a 120 milhões de toneladas de produtos marinhos foram também produzidos. Em outras palavras os produtos marinhos constituem uma proporção muito pequena do alimento total. Neste contexto a aquacultura moderna, utilizando engenharia genética e biotecnologia moderna podem abrir novas avenidas. Mas a aquacultura intensiva apresenta os mesmos problemas ecológicos que a agricultura intensiva. De modo que não podemos depender da expansão da produtividade dos oceanos através da aquacultura para resolvermos o problema da alimentação.

A irrigação é uma componente importante da agricultura moderna. Se a planta não dispuser de água suficiente não pode consumir o fertilizante e não pode produzir mais. Irrigações são por assim dizer uma forma de aliviar a pobreza principalmente porque num solo irrigado várias colheitas anuais se podem efectuar nos trópicos e sub-trópicos e se podem introduzir vários outros tipos de actividades tais como agricultura de culturas mistas com plantas, animais, peixes, etc., o que dá origem a ganhos adicionais para a economia caseira, a segurança e a confiança da qual são aumentadas por este meio. Mas por outro lado, o que está acontecendo por todo o mundo, e por isso a água se coloque ainda mais no topo da agenda científica, é que nós nos tornamos crescentemente dependentes da água do solo, e a sua capacidade tem sido ultimamente excedida. No meu próprio país, nos últimos 40 anos, a proporção de área irrigada tem dependido da água do solo. As águas do subsolo tem estado

a decrescer. Mas a água do solo alimenta hoje cerca de 50% da área irrigada e muitas áreas litorais em que a exploração desta água do solo lidera embora haja em certos pontos invasões pela água salgada do mar. Em termos gerais tem havido nestas áreas uma vantagem positiva em termos de emprego e ganhos adicionais devido à irrigação. Por outro lado o uso insustentável e poluição da água é um dos problemas.

Falemos agora de outros assuntos importantes relacionados com os assuntos em discussão, de alimentar a população no próximo século. À parte dos problemas ecológicos vem a crescente marginalização dos pobres. Isto foi dramaticamente demonstrado na capa dos relatórios da conferência da UNDP — Desenvolvimento Humano de 1992. Ela mostra uma taça de champanhe. No topo da taça, na parte mais larga está 20% da população do mundo com cerca de 82,4% das posses mundiais. Nos 20% do fundo estão escassamente 1,4% dos 'incomes', e entre os dois existe uma classe média variável nas possibilidades de 'income'. Mas é no bilião do fundo, nessas populações cronicamente subalimentadas, que estão os agricultores trabalhando em áreas de exploração não irrigadas e dependentes da chuva. É nessas áreas que se abrem novas oportunidades oferecidas pela engenharia genética no melhoramento para melhor adaptabilidade aos 'stresses' so solo. Muitas dessas populações constituem famílias trabalhadoras não possuindo terras que não têm bens nenhuns: sem terra, sem gado, sem reservatórios de peixes, sem árvores, daí resultando que não têm bens de produtividade e constituem o bilião do fundo da taça. Este tipo de marginalização dos pobres vai crescendo e é esta gente que tem de produzir mais alimento em áreas que são de agricultura de sequeiro. Vejamos agora a pressão populacional. Um grande número de pessoas vive cada vez mais na situação marginal do pobre, em condições extraordinariamente difíceis ao longo de áreas litorais. No Bangladesh uma fracção importante das pessoas vivem junto do mar. É preciso ter presente que 60% das pessoas do mundo vive em regiões costeiras, dentro do 60 km da faixa marítima (A UNESCO diz que este número caminha para 75% nos próximos 20 anos).

Estas populações dependem da pesca, da floresta costeira e fortunadamente porque vivem junto ao mar, encontram um ecossistema de arbustos marítimos («mangrove») únicos de plantas que têm capacidade genética de suportar a invasão da água do mar em estuários de água doce e do mar, pois possuem caracteres genéticos únicos. Estas plantas têm sido submetidas a cortes sistemáticos. Recentes fotografias de satélites mostram que onde esta vegetação costeira foi removida, tempestades costeiras têm produzido tremendas devastações. Estas fotografias mostram que as tempestades costeiras têm devastado zonas do interior (acima dos 200 km da costa) onde esta vegetação deixou de existir, isto é, deixou de haver defesa costeira contra estes intempéries, em termos de vegetação. Assim, à parte de muitos outros problemas, a intensidade

crescente das tempestades originaram agora populações sem defesa junto às costas.

Esta é a razão porque é importante procurar genes que possam fornecer plantas adaptadas a circunstâncias do litoral. Possibilidade de tolerância à água salgada e que com isto se possa estabelecer centros de recursos genéticos para identificar materiais, tais como «mangroves», arroz, *Potrysia* e muitos outros que possuam capacidade para suportar elevada salinidade e invasão da água do mar. Efectuar então estudos especialmente sobre a sua constituição genética, utilizando as modernas técnicas PCR, RFLP e RAPD) e finalmente criando um centro genético de desenvolvimento («genetics enhancement centre») o qual possa produzir combinações genéticas novas e torná-las disponíveis aos melhoradores de plantas. Porque para a agricultura sustentável se requer variedades específicas bem localizadas e diversidade varietal e por isso é importante que estes centros de desenvolvimento sejam capazes de fornecer matérias primas para melhoramento ao nível de base.

Outro problema, referente ao relatório de 1990/93 de desenvolvimento humano da UNDP. O Dr. Mabul Haak (?) era o líder desta equipa e possuía uma capacidade tremenda de capturar pontos importantes e latentes tais como o crescimento do desemprego. No mundo industrializado incluindo o Reino Unido o emprego torna-se um dos mais importantes assuntos nas agendas políticas. Se o emprego se torna uma área de importante prioridade nos E. Unidos, no Reino Unido ou na Europa, pode-se imaginar a posição de outros países como o meu, Índia, China, Bangla Desh, Indonésia, etc., onde temos um enorme atraso e desemprego, em adição com cerca de 15 milhões de crianças nascidas em cada ano. O GDP cresce embora permaneça parado o emprego. Isto corresponderá a mais tecnologia, mais políticas, princípios de gestão a tentar substituir o ser humano. Mesmo os países sem nenhum aumento de população estão enfrentando o problema de desemprego. Entre 1950 e 1980 o grande desafio foi o aumento de produção de produtividade. *Agora, entre 1980 e 2000 sabemos que o mundo tem alimento suficiente se se tiver dinheiro suficiente para o comprar.* O acesso económico ao alimento tornou-se importante. O acesso económico significa realmente empregos. Empregos qualificados valorizados em relação ao tempo. Se eliminarmos as repercussões ecológicas, a degradação dos solos, a disponibilidade diminuta da água, a poluição da água, a perda da diversidade biológica: o acesso económico aos alimentos poderá ser o mais importante desafio científico do séc. 21. O outro problema é entre o terceiro mundo e o mundo industrializado referentes ao GATT que está a ser negociado relativamente ao comércio internacional e aponta para subsídios muito pesados nos países industrializados. Porque os países muito industrializados podem ter despesas elevadas de segurança social. Um agricultor suíço pode ter cerca de 80% de 'income' através de subsídios do governo (os agri-

cultores europeus, os agricultores franceses, etc.). Com o resultado de que nos mercados dos países desenvolvidos a maior parte dos preços são tão baixos que só da sua exportação não se obtém o dinheiro suficiente para pagar os seus produtos. Se estes subsídios forem removidos teríamos maiores oportunidades para o 3.º mundo em termos de agricultura. A razão porque há um pequeno melhoramento em produção como aconteceu no último ano («Ásia Week: porquê arroz que os asiáticos estão a obter neste Outono?») conta-se no facto de isto se dever à introdução de novas variedades. Vietnam, por exemplo, um país completamente dependente da importação de alimentos, exportou no ano passado um milhão de toneladas de arroz. Tornou-se agora o 3.º maior exportador mundial depois da Tailândia e Estados Unidos.

O ponto derradeiro é o assunto do patenteamento: a privatização das indústrias de Engenharia Genética, Biotecnologia e Melhoramento de Plantas no mundo industrializado. Obviamente neste assunto de patenteamento: a cada um se deve dar crédito e pensemos qual o sistema da recompensa e reconhecimento para as famílias rurais, sobretudo mulheres que conservaram as «land races», culturas primitivas ou espécies de gramíneas, os quais se tornaram os ingredientes mais importantes no trabalho de engenharia genética, ou seja as fontes de resistência genética. Já aqui se disse neste Congresso como este importante processo ocorre. Isto foi também explicado nos «FAO-FORA» como, de longe, mais direitos devem haver nos centros de origem e de diversidade e estes agricultores devam receber em retorno alguma coisa, quando eles compram a semente convertida já em produto acabado. Em outras palavras se a pessoa que produz a nova variedade obtém todo o reconhecimento, então o que pensar daquele que fornece os ingredientes empregados para a produção das novas variedades? Eles têm de ser gratificados designadamente de acordo com os direitos do melhorador e os direitos do agricultor. Penso cada vez mais, ao meditar no século 21, e nestas últimas pessoas, as quais são normalmente mulheres muito sofredoras, persistentes e rijas. Elas preservam as sementes. Vivem na fronteira da Índia com os Himalais. São muito resistentes e tentam produzir alguma batata do solo, algum trigo, cevada e trigo serraceno e os que elas tentam pedir-nos é: podem v/ ajudar-nos com as novas tecnologias? Condenadas a este trabalho forçado. Assim que a criança nasce, as raparigas se sentenciam ao 'trabalho forçado' por 14-15 horas diárias. São estas mulheres que por destino compreendem a importância da conservação da Natureza. A mulher da fotografia é aquela que se abraçou à árvore quando os arrendatários vieram cortar as árvores. Esta gente se abraçou às árvores dizendo: «se quiserem cortá-las terão de cortar-nos primeiro». Em outras palavras, estando radicados no solo elas compreendem a importância da conservação dos recursos da sua propriedade comum em flora e fauna. Temos assim uma grande oportunidade de trabalhar com esta gente, o bilião do fundo da taça de champanhe estão

prontos a adoptar as novas tecnologias. Com efeito o pensamento de Paul William Padock em 1963/4 quando escreveu que os agricultores indianos são fatalistas, eles nunca mudarão, etc., está errado. Eles mudaram quase todos e em todo o lado, na Índia, na Ásia em toda a parte, não só com respeito ao trigo e ao arroz mas também no algodão, grão de bico, cana de açúcar, etc. Tal como nos Estados Unidos onde aconteceu que a indústria do milho deu começo à revolução agrícola assim também qualquer um que aprenda a arte e a ciência da boa gestão da fertilidade do solo através dum trigo ou arroz novos, transfere estes ensinamentos e outras culturas, etc. Grandes oportunidades existem hoje com a ciência moderna. Mas, a menos que essa ciência diga respeito às necessidades dessas pessoas, só encontraremos crescentes miséria, marginalização e subnutrição. P. Anderson disse no ano passado em Roma: «nunca o Mundo teve como hoje tantos adultos bem alimentados e tantas crianças famintas».

também depende da qualidade da semente. A combinação genética das sementes e das plantas em combinação com o ambiente em que crescem determinam a qualidade da produtividade e o valor económico do produto.

Eu desejo focar as atenções em algumas das vantagens recentes em genética das plantas que podem melhorar a qualidade genética das sementes e das plantas das quais dependemos para a alimentação. O melhorador ou geneticista olha para a planta do trigo, por exemplo, e pensa nos seus cromossomas e genes. Nos 42 cromossomas de trigo nós presumimos existem possivelmente 150 mil genes diferentes. Genes, unidades de informação que, quando activados na forma certa e no tempo devido, especificam o organismo completo. Os genes são compostos de DNA e transmitem-se de pais para filhos. E assim, eles são o foco da atenção de melhoradores e geneticistas que pretendem saber porque é que uma versão dum planta é diferente da de outra e como as propriedades em indivíduos serão transmitidos para a sua descendência. Assim se acentuaram os geneticistas do melhoramento de plantas.

O geneticista descobre genes e os seus variantes. O geneticista aventura-se em mover genes em novas combinações para modificar as propriedades do organismo. Ao geneticista importa mudar o gene afim de oferecer mais oportunidade para criar organismos diferentes. E assim, no contexto do melhoramento de plantas ele deseja oferecer conselho, conhecimentos como utilizar as melhores variantes dos genes para produzir plantas mais adequadas para servir o homem. Assim o geneticista tem o papel primordial de descobrir genes e variantes que possam ser úteis.

Até recentemente, o geneticista e o melhorador de plantas dedicados a melhorar uma planta cultivada particular, tinham de procurar dentro da espécie os genes que pudessem ser úteis. Isto devido a que o único meio que ele tinha de introduzir novos genes úteis era através do cruzamento sexual, através da

A ALIMENTAÇÃO DO MUNDO NO PRÓXIMO SÉCULO: III — PROGRESSOS DA BIOLOGIA MOLECULAR

RICHARD FLAVELL

(John Innes Center for Plant Science Research, Norwich)

Alimentar a população mundial é um dos mais importantes desafios que o planeta enfrenta. É um desafio extremamente complexo porque envolve problemas políticos, socio-económicos, ambientais e éticos em todas as comunidades do mundo, sejam elas grandes ou pequenas, e em decisões tomadas global ou localmente. Mas também depende da qualidade da semente. A componente genética das sementes e das plantas em combinação com o ambiente em que crescem determinam a qualidade da produtividade e o valor económico do produto.

Eu desejo focar as atenções em algumas das vantagens recentes em genética das plantas que podem melhorar a qualidade genética das sementes e das plantas das quais dependemos para a alimentação. O melhorador ou genetista olha para a planta do trigo, por exemplo, e pensa nos seus cromossomas e genes. Nos 42 cromossomas de trigo nós presumimos existirem possivelmente 150 mil genes diferentes. Genes, unidades de informação que, quando activados na forma certa e no tempo devido, especificam o organismo completo. Os genes são compostos de DNA e transmitem-se de pais para filhos. E assim, eles são o foco da atenção de melhoradores e genetistas que pretendem saber porque é que uma versão duma planta é diferente da de outra e como as propriedades em indivíduos serão transmitidos para a sua descendência. Assim se acercaram os genetistas do melhoramento de plantas.

O genetista descobriu genes e os seus variantes. O genetista aventura-se em mover genes em novas combinações para modificar as propriedades do organismo. Ao genetista importa mudar o gene afim de oferecer mais oportunidade para criar organismos diferentes. E assim, no contexto do melhoramento de plantas ele deseja oferecer conselho, conhecimento como utilizar os melhores variantes dos genes para produzir plantas mais adequadas para servir o homem. Assim o genetista tem o papel primordial de descobrir genes e variantes que possam ser úteis.

Até recentemente, o genetista e o melhorador de plantas dedicados a melhorar uma planta cultivada particular, tinham de procurar dentro da espécie os genes que pudessem ser úteis. Isto devido a que o único meio que ele tinha de introduzir novos genes úteis era através do cruzamento sexual, através da

polinização dum flor com o pólen de outra planta geneticamente diferente. Mas nas últimas poucas décadas, progressos técnicos em obter polinizações surgiram, como também formas de salvar descendências pouco viáveis. E desta forma tornou-se possível efectuar cruzamentos entre espécies distantes e destes cruzamentos obter descendentes que tinham segmentos de cromossomas provenientes de outra espécie introduzidos na planta cultivada. Utilizo para ilustrar isto um exemplo dum diapositivo do meu colega Dr. Pat Heslop-Harrison. Mostra 42 cromossomas de trigo. Há uma secção especial dum cromossoma que cora diferentemente porque o método de tingimento utilizado reconhece DNA estranho. De facto isto corresponde a uma planta que provém originalmente dum cruzamento entre trigo e uma planta estritamente relacionada, a cevada, e a novidade consiste na introdução do segmento cromossómico de cevada no trigo. Este segmento cromossómico transporta muitos milhares de genes, alguns bons, e muitos não bons ou desvantajosos para o melhorador de trigo. Mas um desses genes sabemos que confere resistência a um nemátodo.

Mas de longe e do maior significado para o futuro do melhoramento de plantas têm sido sobretudo os avanços efectuados nos últimos 10 anos pelos genetistas moleculares que aprenderam a isolar genes individuais, as unidades funcionais de DNA, a partir de qualquer organismo no planeta. O que é que quero eu significar por isolar? Quero dizer que onde todo o DNA num complemento cromossómico pode conter 150 mil ou mais genes se consegue isolar, purificar um único gene, separadamente de todos os outros de tal maneira que no tubo de ensaio do laboratório exista uma pura entidade funcional que podemos definir como um gene.

A maior parte deste congresso devota-se à descrição molecular de genes, seus produtos e de como são regulados para determinar processos vitais no homem, nas leveduras, nas bactérias, nas moscas, nos vírus, etc. A expressão na quantidade de informação em genes é muito animadora para aqueles que trabalham neste campo e da mesma forma que também compensa. O volume de informações conduziu-nos a construir uma "base de dados" de computador como um meio de manter uma pista de toda a informação e como meio de investigá-la e compará-la. E tem sido muito interessante verificar que comparações entre genes de organismos diferentes, de homem, de bactéria e plantas, revelaram similitudes em estrutura, função e modos de controlo. O genetista humano necessita portanto de conhecer leveduras e bactérias para interpretar genes humanos e vice-versa. Igualmente, o genetista de plantas tornou-se agora muito mais próximo dos seus colegas que estudam outras espécies. E isto tem um significado tremendo num Congresso como este.

Este enorme avanço de *isolar genes individuais e sermos capazes de estudar a sua função com precisão* é o primeiro dos três avanços que eu desejava assinalar com ênfase neste momento. O segundo é a capacidade de

modificar e de tornar a produzir inteligentemente estes genes no laboratório de modo a que o produto a que dê origem seja diferente ou que eles sejam activados numa parte diferente da planta ou em resposta a um sinal ambiental diferente.

Tornar a produzir e a modificar genes significa modificar a sua estrutura química, a sua sequência química, adicionar e subtrair, modificando e substituindo, partes a partir de funções equivalentes de outras espécies. De modo inteligente significa aprender as regras de como isto se faz de modo a que se estivermos de posse de genes funcionais eles produzirão coisas novas no organismo em que tiverem sido introduzidos. A consequência de aprendermos como fazer isto significa que não precisamos mais de estarmos satisfeitos apenas com os variantes de genes que encontramos em organismos de populações selvagens. Temos agora o poder de fazer gerar o nosso próprio catálogo de variantes genéticas e não necessitaremos de confiar apenas naqueles que se acumularam ao longo do tempo na Natureza e que fomos e somos capazes de encontrar. A *terceira coisa* que desejo destacar é o progresso na nossa *capacidade de transferir genes isolados e recriar no laboratório de novo num organismo e neste caso em plantas cultivadas* que o melhorador deseja manipular. Uma palavra de explicação acerca disto: o que é que quero significar com o re-inserir em? Em termos simples eu quero dizer que nós necessitamos de transferir o gene do nosso tubo de ensaio para uma única célula vegetal de modo a que se torne incorporado de forma estável no complemento normal dos cromossomas da planta e seguidamente cultivar essa célula de forma a que ela prolifere e se diferencie numa planta normal que siga o ciclo normal, e a qual se possa propagar numa forma normal. Isto, nos anos setenta, quando pela primeira vez começámos a obter genes isolados no tubo de ensaio não parecia ser uma coisa simples de realizar. No entanto nos finais dos anos setenta ocorreu um "break through" que teve um grande significado. Foi descoberto que a bactéria que produz tumores cancerígenos em caules de plantas consegue esse objectivo cancerígeno através da transferência de alguns dos seus genes para os cromossomas das células da planta hospedeira. De forma que quando se descobriu que havia um processo na Natureza que já executa isto e que tem feito isto ao longo dos tempos, então os genetistas e engenheiros genéticos das bactérias puderam descobrir quais os genes da bactéria que eram transferidos e substituir esses genes por aqueles do tubo de ensaio que precisavam de ser inseridos. Então um grande número de experiências foram feitas desde o caso em que o gene a ser transferido era primeiro posto na bactéria e então ser permitido à bactéria infectar a planta, em condições de produzir tumores. No entanto, o gene que interessa era transferido e então associado com procedimentos de cultura de células, plantas completas eram regeneradas. A primeira experiência com êxito para inserir genes desta maneira foi publicada na lite-

ratura científica em 1982, há cerca de 10 anos. Desde então os genetistas de plantas em muitas e diferentes partes do mundo têm sido extremamente activos e originaram o que eu penso tenha sido um progresso estrondoso. Uma gama muito larga de espécies pode hoje ser modificada geneticamente por genes de qualquer organismo, que tenham sido isolados num tubo de ensaio. E plantas sexualmente maduras podem ser produzidas as quais o melhorador de plantas pode reproduzir. A gama de plantas já é considerável, mas ainda há excepções notáveis e assim temos ainda muito para fazer.

Estas três coisas que provêm do mundo da Genética nos últimos 10-15 anos são sem dúvida de importância histórica e eu diria de significado incalculável para o futuro do melhoramento das plantas cultivadas. Deixámos de ficar limitados aos genes e à variância genética das espécies em causa. E a enorme produção abrangendo todo o espectro de genes dos humanos, das leveduras e das bactérias será agora relevante e disponível para o melhoramento das plantas cultivadas. Acrescento que, no mundo dos genetistas houve uma mudança técnica, cultural e intelectual durante os últimos 10 anos e isso já produziu um substancial impacto entre os melhoradores de plantas da actualidade e do futuro. Se houve toda esta mudança em conhecimento a que me referi e se estão ocorrendo novas oportunidades, o que estaremos fazendo com elas? Gostaria agora de dedicar um pouco de tempo para lhes apresentar alguns exemplos da espécie de avanços que estão ocorrendo os quais marcam uma fase para uma nova era de importante produção económica de plantas. O primeiro é um exemplo que provém dos esforços do meu próprio grupo de investigação. O que se fez foi tomar um gene duma bactéria cujo produto quando posto dentro duma célula pode tornar um substrato incolor em azul. Tornamo-nos assim capazes de facilmente ver a presença dum gene activo. Este gene de bactéria foi modificado no laboratório, acrescentando-se-lhe algumas partes dum gene isolado de trigo e essas partes do trigo eram sinais que determinavam que o gene seria activado apenas na semente e não na raíz, na folha ou outras partes da planta de trigo. Assim, um novo gene composto foi produzido e colocado numa planta experimental tal como o tabaco e a semente do tabaco foi examinada e viu-se uma boa quantidade da cor azul na parte exterior da semente e não no meio (observação numa secção da semente) onde está o embrião. E isto nos diz que teremos aprendido a inserir um gene novo nesta planta de modo a que o gene seja activo apenas na semente porque não verá nenhuma cor azul em nenhuma outra parte da planta, e além disso numa parte particular da semente. Assim, aprendendo a praticar esta tecnologia quer dizer que poderemos inserir muitas e diferentes espécies de funções e não apenas proteínas que tornam azul o substrato em sementes de importância económica. E as experiências estão todas seguindo bem o seu caminho para melhorar o conteúdo nutritivo de espécies particulares de sementes, para modificar pro-

priedades já nelas existentes: diferentes qualidades de amidos, diferentes qualidades de óleos para os processos alimentares, ou produzir diferentes qualidades de produtos que estão completamente fora da história evolucionária da espécie em causa, são um exemplo de que poderemos conferir nova espécie de propriedades a sementes específicas. Um segundo exemplo que escolhi foi porque podereis vê-lo nas lojas em primeiro lugar, e também porque podereis lê-lo na literatura. Vemos aqui dois tomates, os quais diferem por um simples gene. Um deles, quando colhido da planta e armazenado, mostra em pouco tempo sinais de apodrecimento. O outro, que provém duma planta geneticamente idêntica à anterior faz excepção num único gene que lhe foi adicionado e que impede a degradação da parede celular na epiderme do fruto e obsta ao seu amolecimento e podridão. Trata-se duma intervenção genética dum gene "fabricado" no tubo de ensaio, o qual prolonga a vida em prateleira ("shelf life") do tomate. É um dos primeiros exemplos, não o mais importante e porque é o primeiro, valeu a pena conhecer e pensar sobre ele. Esta forma de propriedade será muito útil para o mercado de verduras ou supermercado, porque muito menos fruto estragado será deitado fora e poderá também ser útil para aqueles que normalmente compram mais do que o que consomem em curto prazo. E poderemos conservar frutos por mais tempo em casa. É também útil para o processador de alimentos quando se usa tomates.

O terceiro exemplo de que gostava de falar é provavelmente de muito maior significado para a alimentação do mundo. Este exemplo é o da resistência contra insectos. Em tentativas para resolver a queda breve da produção alimentar, podemos aumentar os potenciais produtivos da semente que se cultiva ou pode tentar-se preencher a falha existente entre as produções comuns obtidas e os potenciais possíveis para a semente particularmente em causa. A falha ocorre por toda a espécie de razões e uma delas é o prejuízo produzido por insectos e outra a das doenças. Um número de primeiros objectivos que os genetistas moleculares atacaram está dentro desta falha, ou seja, em métodos que forneçam novos genes, novas fontes de resistência aos insectos. Os insectos causam enormes prejuízos, particularmente em climas tropicais. Há décadas tinha-se descoberto que esporos de algumas bactérias bem conhecidas continham uma proteína que era tóxica para certas larvas de insectos. Consequentemente, culturas bacterianas eram produzidas comercialmente e os esporos usados como insecticidas eram distribuídos por "spray" sobre plantas cultivadas de muitas fontes e em muitos sítios do globo. E funcionavam como insecticidas porque essa proteína do esporo quando comida por este tipo de larva tornava as larvas doentes, não se multiplicavam com a rapidez normal e assim o grau de infestação diminuía.

Mas para o genetista da actualidade este tipo de conhecimento conduziu imediatamente à pergunta de se poderíamos isolar o gene dessa bactéria, o qual

é responsável pela produção dessa proteína e colocar esse gene na planta de forma a que a célula vegetal produza um pouco dessa proteína. De modo a que quando essas larvas atacarem a planta elas rapidamente adoecem e o ciclo epidemiológico é interrompido e assim a planta sobrevive muito melhor. Este gene foi de facto isolado, reconstituído e inserido em diversas espécies com resultados extremamente favoráveis (tomateiro, batateira, milho e algodoeiro). O produto deste gene é tóxico para este tipo de larvas mas toda a evidência sugere que não é tóxico para o ser humano. Os prejuízos causados nas cápsulas do algodoeiro por estas lagartas são de tamanha importância económica que, para os combater, se utilizam vultuosas e caras quantidades de insecticida, pulverizadas sobre a cultura, em todas as partes do mundo em que o insecticida possa ser obtido. É uma tragédia que prejuízos ambientais de tamanhas proporções tenham sido criados por essas aplicações de insecticidas.

Foi portanto a vez do melhoramento genético, o qual não resultou de genes existentes na espécie algodoeira mas que se obteve a partir dum gene duma bactéria que foi transferida para a planta.

Isto confere vantagens económicas ao agricultor de algodão e também protege o ambiente, devido à redução na aplicação de insecticidas.

Dr. Swaminathan, referiu-se à luta integrada contra insectos. Esta é a melhor maneira de tratar de problemas associados com o controlo de insectos. A introdução desta sorte de genes de resistência duma bactéria permite-nos controlar apenas um insecto específico que ataca o algodoeiro, porque um produto específico duma bactéria é apenas tóxico para uma gama restrita de insectos. Para atingir um insecto diferente usa-se um gene bacteriano diferente mas relacionado. Usando portanto esta tecnologia concentramo-nos numa específica lagarta. Ela só funciona quando a lagarta pica o tecido específico da planta. De modo que se há outros insectos que não se alimentam das plantas que as cercam, eles não são molestados. Existe portanto a vantagem potencial de se reduzir o emprego de insecticidas químicos e de podermos integrar isto num sistema que conduzirá à manutenção de insectos benéficos.

O exemplo que desejo apresentar a seguir é relacionado com o anterior. Muitos insectos transportam virus, os quais por seu intermédio os transmitem duma planta para outras. Epidemias catastróficas de virus podem ocorrer, as quais reduzem substancialmente a produtividade das plantas. Uma série importante de experiências foi efectuada nos últimos anos, as quais abrem novos caminhos de controlar virus em plantas cultivadas. Descobriu-se que se toma uma parte dum gene dum virus que codifica para a proteína que normalmente fornece um escudo protector contra os genes do virus. Isto é, se isolarmos o gene que especifica para essa proteína, se lhe dermos um novo "design" no laboratório, e o pusermos de novo numa célula vegetal, totipotente, e dela regenerarmos a planta mutante, o virus deixa de se multiplicar nas células, após

a re-infecção e a epidemia não se desenvolve nas plantas. Não sabemos porquê este resultado, mas ele foi obtido para cerca de uma dúzia de diferentes vírus e a proteína codificada e inserida fornece resistência para o tipo de vírus do qual o gene da proteína proveio. Experiências mais recentes mostram que se pode extrair parte do gene viral que facilita a replicação dos genes do vírus. Quando a este se dá novo "design" e se insere na planta, também parece que se bloqueia a replicação do vírus invasor, novamente através de mecanismos que ainda não compreendemos perfeitamente. Quando os vírus se multiplicam numa célula vegetal, na qual foi incorporado por um insecto, eles com rapidez se deslocam para outras células e outras partes da planta. E isto é a razão porque a planta morre. Tornou-se assim patente que podíamos recriar certos genes do vírus, os quais interferem com o processo de expansão. Assim poderá haver uma terceira maneira de controlar vírus em plantas. Assim se criam meios de interferir com a forma como o vírus é reconhecido especificamente e recolhido pelo insecto vector.

Este tipo de experiências, cujos resultados não foram previstos por aqueles que as começaram, representou uma surpresa maravilhosa e, quanto a mim, marcou a fase de maior progresso inovador do melhoramento de plantas.

Numerosos ensaios de campo já foram efectuados em condições agrícolas em plantas, modificados geneticamente como se descreveu e as vantagens já mencionadas se mantiveram nessas condições de campo.

No contexto do arroz uma das maiores limitações da produtividade, é a doença *Tungro*, prevalente no Sudoeste da Ásia. Vem da interacção entre dois vírus diferentes. Tem já havido investigação extensiva para resistência genética e alguma tenha sido encontrada. Está-se no entanto muito longe duma situação satisfatória para o melhorador de plantas de produzir variedades sustentáveis resistentes à devastação causada por estes vírus.

A informação a que me vou referir sugere uma forma inteiramente nova de conferir este tipo de resistência genética ao arroz. Faz parte do Programa Rockefeller e traz a nova ciência, a nova Genética Molecular, ao arroz. Um número de laboratórios acordou em comprovar os genes dos vírus que causam esta doença e em re-inserir os genes recriados ("redesigned") nas plantas do arroz de modo a conferir-lhes este tipo de resistência. As experiências ainda não se completaram mas estão no bom caminho. E creio que há um grau elevado de esperança de uma forma ou outra de descobrir caminhos de utilizar genes geneticamente recriados ("redesigned") no laboratório, para reduzir consideravelmente os problemas associados com estes vírus no Sudoeste Asiático.

Estes tipos de exemplos ilustrarão o facto de se perspectivar de uma forma ou outra um impacto favorável na produção de alimento. Nós estamos ainda no limiar e estou-vos dando um quadro perspectivando o futuro. Contudo, forneci-lhes estes exemplos não só por causa do seu impacto visual, mas

também porque ilustram o uso de parte de genes originados fora das espécies vegetais. Mas, embora estes genes venham a ter um grande impacto, o comportamento da planta cultivada dependerá grandemente, como é óbvio, na maioria ou em quase todos, dos seus genes indígenas, isto é, daqueles que evoluíram na espécie.

E certamente não desejo que interpretem o que eu disse atrás, como significando que o melhoramento das combinações de genes dentro da espécie não seja ou vá a ser a parte sempre contínua e sempre importante do melhoramento das plantas. Os processos de melhoramento de plantas que utiliza os genes das nossas espécies de plantas cultivadas nunca poderão ser relaxados. Realmente existe sempre o argumento de que eles devem ser feitos mais eficientes. De modo que não nos surpreenderá que melhoradores que obtiveram fundos para investir em novos métodos se viraram para a Genética Molecular para ver se as novas técnicas podem ser incorporadas para tornar mais eficiente o processo de melhoramento de plantas.

Dar-vos-ei um exemplo desse de progresso o qual já influencia o cenário do melhorador de plantas. Se você for um melhorador e queira incorporar um gene cujo efeito seja fácil de ver tal como o gene ananizante que produziu a Revolução Verde, isso é fácil e você vê se a planta é alta ou baixa e assim poderá inferir da presença do gene, muito facilmente. Por outro lado se você quer saber dum gene de resistência não poderá dizer nada a não ser que se exponham as plantas à doença. Mas na maioria dos casos, as propriedades que um melhorador de plantas quer manipular são codificadas por um grande número de genes. Assim, é frequentemente muito difícil, consumidor de tempo e dispendioso, pelo menos, saber se obtivemos toda a combinação de genes que queremos. E isto é o assunto em que o Genetista Molecular está trabalhando. Trata-se de produzir mapas de cromossomas. Cada uma destas linhas ou números ao longo dos cromossomas representa um gene ou pedaço de DNA particular de que se dispõe no tubo de ensaio. Os genetistas moleculares têm-se atarefado a produzir estes mapas únicos para fornecer uma série de marcos sinalizadores para os genetistas e melhoradores.

Se possuímos um mapa como este, podemos perguntar se cada um destes segmentos cromossômicos contendo cada um destes pedacinhos de DNA isolado estará presente ou não. Se o segmento cromossômico estiver presente, nós poderemos presumir com elevado grau de certeza que qualquer gene importante que esteja perto do segmento, esteja também presente, sem necessidade de medirmos a efectividade do próprio gene. Uma fase mais elaborada deste tipo de técnica foi estabelecida que nos capacita de dizer se o segmento cromossômico que foi marcado por uma destas sequências proveio da mãe ou do pai e sabemos que transportava o gene favorável que queríamos. Assim, temos um mecanismo para determinar quais os segmentos cromossômicos que estão presentes, se se

obteve o gene favorável ou desfavorável e assim joeirar para assegurar que as plantas que utilizamos são aquelas que transportam os genes certos, mesmo que seja muito difícil de dizer das consequências desses genes numa prova de campo.

Estas técnicas diferenciadoras baseadas em marcadores moleculares estão em uso rotineiro nas principais Empresas de melhoramento, aquelas que possuem dinheiro para investir em investigação e tecnologia. O que elas fazem é novo e efectivo e desejam desempenhar uma parte crescente no processo. Mas para utilizar isto é necessário saber que genes valiosos estão estreitamente ligados a cada um destes segmentos. Porque eles não podem servir de marcadores a menos que sejam marcadores para genes em relação aos quais sabemos alguma coisa. Isto é uma inteiramente nova proliferação da Genética actual: o descobrir de genes de importância agrícola que fazem parte destes marcadores moleculares. Por exemplo, o grupo de M. Gale e um grupo em Banghor determinaram onde um gene conferindo resistência a um particular fungo está localizado e descobriram um marcador particular que indica aos melhoradores se esse gene foi produzido em trigo, milho, arroz, batata, tomate e "pearl millet" (milho painço) e começamos a ver esta tecnologia molecular a infiltrar-se no processo de melhoramento de plantas cultivadas. À medida que mapas moleculares de genes importantes forem sendo criados é possível comparar o mapa de uma espécie com o de outra. Nova informação foi já fornecida neste Congresso a qual mostra as relações entre as posições de genes em cromossomas de arroz e as de cromossomas de trigo. Apresento um diapositivo onde se vê comparativamente e através da marcação de cromossomas com barras transversais simbolizando genes que os cromossomas das duas espécies são extremamente relacionados uns com os outros e isto dá-se há já bastante tempo. Tomando fragmentos de DNA de trigo e indagando onde eles residem nos cromossomas e reciprocamente bocados de DNA de arroz e buscando a sua localização em trigo, se verifica uma estreita relação. Ainda mais, verifica-se que a ordem de localização dos genes é paralela em ambas das espécies. Isto é um novo e provocativo tipo de informação conjuntamente produzido pelo Instituto Nacional de Recursos Agrícolas (Nat. Inst. of Agric. Resources) no Japão (Drs. Menobi e Kurata) e o Cambridge Lab. Norwich (Graham More, Mike Gale e colaboradores). A descoberta de que durante a divergência destas duas espécies, uma da outra, em longos períodos de tempo, não se misturaram todos estes genes mas ficaram na mesma ordem ou quase isso. Penso que é uma descoberta de base que terá um impacto substancial no melhoramento de plantas, no futuro. Porque é que eu digo isto? Porque se na verdade há muito mais detalhe do que os cem marcadores normais indicam, os genetistas que descobrirem genes em arroz estarão dizendo onde procurar genes equivalentes no mapa cromossómico de trigo e do milho, etc. E vice-versa. E os genetistas e melhoradores de todas

as gramíneas cultivadas serão capazes de reunir conjuntamente toda a sua informação numa escala nunca antecipada antes deste momento.

Terminarei levantando algumas das questões-chave que dir-nos-ão até que ponto as novas descobertas da genética de que falei terão impacto na produção de alimento. Aqui nós necessitamos de lembrar as mensagens-chave do Dr. Swaminathan. A primeira dirige-se à nossa competência científica. Propositadamente desenhei um quadro optimista do que é honestamente justificável nos laboratórios científicos actuais. Não é que vos tenha dito alguma coisa que os laboratórios não tenham conseguido duma forma reproduzível. Mas o que não fiz foi indicar-lhes que toda a tecnologia do "know how" não está espalhada por todos os laboratórios e todos os programas de melhoramento de plantas do mundo. O que eu vos apresentei foi a mais avançada tecnologia a qual existe em muitos poucos laboratórios e está limitada às capacidades de relativamente escassas pessoas.

Para que esta tecnologia consiga impacto substancial duma forma alargada o "know how" e a tecnologia têm de ser espalhados muito mais largamente através de todos os países do mundo. Isto significa que muito mais tem de ser feito realmente. Temos também de indagar o quanto isto tem sido praticado nas plantas cultivadas mais importantes, que são chave do mundo.

Ouvimos dizer que o arroz seja talvez o número um em termos de plantas que mantêm a maior parte das pessoas vivas e ouvimos dizer que a Fundação Rockefeller fundou um programa muito elucidativo e dinâmico para trazer este tipo de Genética Molecular para as mãos dos melhoradores de plantas, nos países onde isso é requerido. Isto não pode ser dito de nenhuma outra espécie cultivada. Contudo, muitas das vantagens de que se falou, desenvolveram-se nos laboratórios dos países desenvolvidos, nas indústrias e no sector público. E portanto respeitam o milho, um pouco o trigo, a batata e o tomate, mas as plantas-chave cultivadas, das quais a segurança do mundo depende, ainda não foram realmente afectadas duma forma substancial e suficiente. Damo-nos também conta de que a introdução de genes novos alheios às espécies cultivadas, os quais queremos utilizar através do mundo, criou uma enorme preocupação. Não estaremos a criar plantas que afectarão prejudicialmente o nosso ambiente? Não serão prejudiciais às cadeias alimentares? Não poderão tornar-se ervas daninhas?

Certamente considero prudente avaliar tudo que estamos introduzindo no nosso ambiente e na nossa dieta alimentar, mas estou absolutamente confiante que um enorme volume de plantas com benefícios reais, pesará no escrutínio como não estando associado com nenhuns riscos inaceitáveis. O produto de genes estranhos não será menos seguro para o ambiente ou para nós do que qualquer gene que evoluiu dentro da espécie, por largo tempo. Não há portanto nenhuma base para rejeitar automaticamente plantas melhoradas por estes métodos. O que é importante é o peso do benefício na razão de risco. Um produto

não poderá ser avaliado apenas pelos seus pretensos riscos. Isto levar-nos-ia a um beco sem saída. Os benefícios devem também ser ponderados na análise. A este respeito importa que nós, na nossa posição de excedentários alimentares no mundo desenvolvido e discutindo caminhos através de legislação, não devamos tomar decisão sobre o que é aceitável ou não para os nossos irmãos seres humanos em países em que os benefícios poderão ser muito diferentes. Não devemos estar a rejeitar uma tecnologia ou um exemplo que outros, em circunstâncias diferentes, possam achar extremamente benéficos; em terceiro lugar, será que o "know how" e os resultados estarão no caminho certo da sua devida aplicação para combater a fome?

Esta é uma questão muito complexa. Já nos referimos ao facto que a nova tecnologia se tem desenvolvido em laboratórios de indústrias e de sector público do mundo desenvolvido. A maioria disto é realmente pago e portanto não está disponível para ser utilizado para ganhos comerciais sem recompensa financeira paga ao inventor do gene ou do processo. Exportação das vantagens destes genes ocorrerá presumivelmente nos países desenvolvidos, sujeitos aos factores normais de negócio e regras de patentes. Mas nos países em desenvolvimento onde as necessidades são muito maiores e a pressão populacional também, onde os recursos escassos e uma infraestrutura pobre tornam uma empresa incapaz de desenvolver um negócio satisfatório, a nova tecnologia não poderá ser aplicada. Aí será o local em que por necessidade, uma agência deverá actuar. E seguramente deste modo as vantagens genéticas se estabelecerão onde são necessárias mesmo quando as patentes tiverem de ser impostas. Isto significa que as companhias, doando tais tecnologias para benefício dos pobres, talvez em condições em que tal atitude provavelmente não prejudique o seu negócio nos países desenvolvidos, cumprirão este desígnio.

E penso que existem boas indicações de muitas das companhias liderando neste campo, estarem na disposição de doar as suas tecnologias para auxiliar os países pobres, em circunstâncias que não interfiram com o seu negócio nos países desenvolvidos.

Mesmo quando não haja constrangimentos legais ou pragmáticos daquela natureza, existem enormes dificuldades logísticas e aqui cabem alguns pontos referidos pelo Dr. Swaminathan. Para que um novo gene ou novo tipo de planta possa ser de valor, isto tem de ser incorporado em cultivares que estejam adaptados às condições locais da comunidade rural e do ambiente. Isto referindo programas de melhoramento no Reino Unido, América ou qualquer outro lado. Portanto o investimento normal que se aplica a estas plantas-chave, cultivadas nos países desenvolvidos, e a aplicação dos avanços da Genética Molecular devem ser estimulados num considerável grau e este investimento é um assunto para governos. Se não fizermos isto, não estaremos actuando em favor da campanha de produção alimentar.

Acima de tudo eu tenho algum pessimismo sobre se os governos financiarão este programa na escala devida se quiserem resolver os problemas das necessidades em todos os locais distribuídos pelo mundo.

Mas tenho a esperança de que esta mensagem de preocupação que resulta deste tipo de considerações reunida aos conhecimentos das novas descobertas da Genética que criam novas oportunidades serão tomados em plena consideração como uma mensagem de optimismo sobre termos de investir mais, porque existem maiores “chances” de sucesso do que aquelas que existiram no passado. É comumente reconhecido que as novas tecnologias frequentemente levam 10, 20, 30, ou mais anos para se realizarem no sítio do mercado. E não penso que a Genética Molecular de que falo seja diferente dessas tecnologias. Portanto, a atitude e investimentos e tipos de decisão que se tomarem neste momento, são aquelas que influenciarão a situação alimentar, com sorte e trabalho duro, durante 20 a 30 anos, altura em que, segundo o que ouvimos, haverá mais cinco bilhões de pessoas para alimentar. Penso que os genetistas desejarão mais do que de antes, aceitar o desafio de transmitir o conhecimento e o “know how” para o mundo, do melhoramento de plantas para ajudar a resolver alguns destes problemas, no local onde a necessidade é devidamente identificada. O que eu espero é que aqueles que melhor julgarem as opções, isto é, as populações locais, farão as decisões sobre que qualidade de melhoramento genético a usar, quando e como, porque elas saberão que há novas opções disponíveis e elas saberão acerca delas, porque os novos avanços não serão apenas efectuados nas bancadas dos laboratórios mas também serão disseminados através de programas de informação tais como este. O papel do genetista é aumentar as opções disponíveis e será para os outros decidir quais deverão ser utilizadas, e quando. Espero que os genetistas estejam prontos e que todos nós, cidadãos do mundo, tenhamos consciência da magnitude do problema, possamos estar excitados, mas que saibamos que possuímos novas ferramentas para utilizar e que ponhamos mãos à obra para resolver o problema. **Porque o tempo está a esgotar-se.**

EXPRESSÃO DOS GENES DO AGRUPAMENTO DA α -GLOBINA HUMANA

LUÍSA ROMÃO¹

O eritrócito humano é uma célula altamente especializada cuja principal função é o transporte de oxigénio dos pulmões para os tecidos periféricos e o retorno de CO_2 e H^+ para os pulmões. Estas funções de transporte são mediadas pela hemoglobina (Hb), uma metaloproteína tetramérica que corresponde a 95% da proteína do eritrócito. Para funcionar em condições fisiológicas, o tetrâmero de hemoglobina deve ser constituído por duas cadeias de tipo α - e duas cadeias de tipo β -globina. Cada uma das subunidades da hemoglobina no tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ contém, na cavidade hidrófoba, um só grupo prostético que transporta oxigénio, o heme, o qual é composto por protoporfirina IX ligada a um só ião Fe^{++} (Weatherall e Clegg, 1981). A precisa organização espacial das quatro subunidades da hemoglobina no heterotetrâmero determina interacções alostéricas críticas para o transporte eficiente de O_2 . A função normal do eritrócito necessita assim de uma expressão e estabilidade equilibradas das subunidades proteicas α - e β -globina. Um defeito na expressão da cadeia α - ou β -globina origina um desequilíbrio na síntese das cadeias globínicas com consequentes defeitos na formação do tetrâmero, função e viabilidade do eritrócito. A perda da capacidade sintética da α - ou β -globina conduz a síndromas clínicos classificados como α - ou β -talassémias, respectivamente. No entanto, a talassémia também pode ser devida a hemoglobinas instáveis (Weatherall e Clegg, 1981; Liebhaber, 1989; Kazazian, 1990).

As talassémias são uma das doenças genéticas mais comuns (Weatherall *et al.* 1986; Modell e Bulyzhenkov, 1988). Na sua forma mais grave, a talassémia origina uma significativa morbilidade e mortalidade, por todo o mundo. A gravidade clínica num indivíduo, está directamente correlacionada com o grau de desequilíbrio da síntese de cadeias funcionais α - e β -globina. Já se identificaram mais de 140 diferentes mutações que diminuem ou inibem totalmente a expressão de um ou mais genes α - ou β -globina (Liebhaber, 1989; Kazazian,

¹ Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge; Departamento de Genética Humana; Av. Padre Cruz; 1699 Lisboa Codex.

1990; Baysal, 1992). Estas mutações podem ser herdadas só por si, ou em combinações, resultando num espectro variadíssimo de fenótipos. A primeira descrição clínica de talassémia foi publicada por Cooley e Lee em 1925 e a base molecular para diferentes síndromas talassémicos foi estabelecida, pela primeira vez, nos anos 70 (Ottolenghi *et al.* 1974; Chang e Kan, 1979). Após estas descrições iniciais, tem-se explorado exaustivamente a natureza altamente complexa dos fenótipos talassémicos e muitas mutações têm sido analisadas a nível molecular.

1. A função da hemoglobina normal

Cada uma das α - e β -globinas é codificada por um ou mais genes. À medida que o mRNA da globina é traduzido, a globina vai-se «enrolando» à volta do grupo prostético heme. Esta interacção entre o heme e a globina estabiliza a estrutura terciária da globina e protege a face hidrófoba do anel porfirina do ambiente aquoso da célula (Perutz *et al.* 1965). As subunidades α - ou β -hemoglobina ligam-se para formar um dímero $\alpha\beta$, numa reacção mediada por interacções electrostáticas entre as subunidades α - carregadas positivamente e as subunidades β -hemoglobina, carregadas negativamente (pls de 8.1 e 6.6, respectivamente; Bunn e McDonald, 1983). Dois destes dímeros $\alpha\beta$ ligam-se subsequentemente, para formar o tetrâmero $\alpha_2\beta_2$.

O heterotetrâmero de hemoglobina $\alpha_2\beta_2$ pode ligar-se reversivelmente a quatro moléculas de O_2 de um modo cooperativo, sob pressões parciais de oxigénio que sejam fisiológicas (Pauling, 1935). *In utero*, a função do tetrâmero de hemoglobina é o transporte de oxigénio da placenta para os tecidos fetais. Após o nascimento, a hemoglobina é oxigenada à medida que passa através dos capilares pulmonares. Alterações no pH, temperatura, pCO_2 e concentração de 2,3-difosfoglicerato, no sangue, podem desviar a curva de ligação do oxigénio à hemoglobina, numa direcção geralmente favorável às necessidades locais de O_2 (Weatherall e Clegg, 1981). Estas alterações alostéricas são críticas à função da hemoglobina e apenas podem ocorrer numa macromolécula heterotetramérica correcta. Os homotetrâmeros, tais como γ_4 (Hb Barts) e β_4 (Hb H) que se formam apenas sob condições de limitada síntese da α -globina (α -talassémia) não são funcionais. Estes homotetrâmeros, tal como os monómeros α -globina livres que se acumulam na situação de β -talassémia, têm uma diminuída estabilidade e são tóxicos para o eritrócito (Nathan e Gunn, 1966; Yatagnas e Fessas, 1969; Wickramasinghe *et al.* 1973; Rachmilewitz *et al.* 1976). Assim, tanto as deficiências qualitativas como as quantitativas de produção da globina podem alterar a função normal do eritrócito, quer através da diminuição da concentração normal de hemoglobina quer pela produção de moléculas de hemoglobina instáveis e/ou disfuncionais.

2. Aspectos gerais dos genes das globinas e seus agrupamentos

2.1. Estrutura

Os genes que codificam para as cadeias tipo α estão agrupados no braço curto do cromossoma 16 (16p13.3), enquanto os genes tipo β se localizam no braço curto do cromossoma 11 (11p15.5) (Deisseroth *et al.* 1977; Deisseroth *et al.* 1978; Nicholls *et al.* 1987a; Pearson *et al.* 1987; Buckle *et al.* 1988). Em ambos os agrupamentos, os genes estão organizados de 5' para 3', na mesma ordem com que são expressos durante a ontogénese. No agrupamento da β -globina, os genes estão organizados na seguinte ordem: gene embrionário ϵ -globina, genes fetais $\zeta\gamma$ e $\Lambda\gamma$, pseudogene $\Psi\beta$ e genes adultos δ - e β -globina (Figura 1A).

O agrupamento génico da α -globina contém, de 5' para 3', o gene embrionário ζ -globina, três pseudogenes $\Psi\zeta$, $\Psi\alpha_1$ e $\Psi\alpha_2$ e dois genes fetal/adultos α_2 - e α_1 -globina (Figura 1B). Na extremidade 3' do agrupamento encontra-se um outro gene de natureza indeterminada, o gene θ_1 -globina (Albitar *et al.* 1989).

Todos os genes das globinas apresentam três exões, separados por dois intrões (IVSs). Cada um dos exões corresponde a um domínio funcional da proteína: o exão 1 codifica para a região de ligação ao heme; o exão 2 codifica para os peptídeos que participam nos contactos $\alpha_1\beta_2$; o exão 3 codifica para a região que participa nos contactos de empacotamento $\alpha_1\beta_1$ (Dickerson e Geis, 1983). Estes genes podem divergir significativamente no tamanho e composição nucleotídica dos seus IVSs e na estrutura dos seus promotores. Cada um dos genes é transcrito e processado para se obter um mRNA de aproximadamente 600 nucleotídeos (excluindo a cauda poli-A), que codifica uma proteína de 141 ou 146 aminoácidos (α - e β -globinas, respectivamente; Liebhaber *et al.* 1980; Lawn *et al.* 1980). Alguns dos aminoácidos críticos para a ligação ao heme, para a estabilidade da estrutura secundária e terciária e para as interações α - β , são altamente conservados (Goodman, 1981). Por isso se pensa que todos os genes da globina sejam derivados de um precursor comum (Goodman, 1981; Goodman *et al.* 1982).

Ambos os agrupamentos contêm na sua extremidade 5' uma região que demonstra hipersensibilidade à DNase I, em células eritróides (região de controlo do locus; LCR; Figura 1) a qual é crítica para uma activação coordenada e expressão equilibrada dos genes (Tuan *et al.* 1985; Forrester *et al.* 1986; Higgs *et al.* 1990a; Jarman *et al.* 1991).

2.2. O agrupamento génico da α -globina

O agrupamento génico da α -globina, de 30 kilobases (kb), está localizado numa zona rica em G+C, no braço curto do cromossoma 16 (16p13.3-pter;

Fischer-Ghodsian *et al.* 1987a; Buckle *et al.* 1988). Este agrupamento contém sete genes e pseudogenes e uma região de controlo do *locus*, localizada a 40kb a 5' do agrupamento (Figura 1B; Higgs *et al.* 1990a; Jarman *et al.* 1981). Existem sete regiões hipervariáveis (HVRs) dispersas por todo o agrupamento. Estas HVRs estão localizadas a 70kb a 5' do gene ζ -globina (5'HVR; Jarman e Higgs, 1988), entre os genes ζ - e $\Psi\zeta$ -globina (inter- ζ HVR; Goodbourn *et al.* 1983), nos dois intrões dos genes ζ - e $\Psi\zeta$ -globina (Higgs *et al.* 1989) e a 4kb a 3' do gene θ_1 -globina (3'HVR; Jarman *et al.* 1986). Cada uma das HVRs pode conter mais de 450 repetições de uma de cinco sequências ricas em G+C [5-57 pares de bases (pb)], quatro das quais apresentam um núcleo comum de 11pb com a sequência GNGGGGNACAG (Higgs *et al.* 1989). O tamanho altamente variável destas regiões torna-as marcadores muito informativos para a análise de haplotipos (Higgs *et al.* 1986). Também se podem encontrar neste agrupamento, múltiplas cópias de elementos da família *Alu* I (Fox *et al.* 1983).

Dos sete genes e pseudogenes presentes no agrupamento génico da α -globina, três são funcionais, três são pseudogenes e um é de importância indeterminada. O gene ζ -globina está localizado na extremidade 5' do agrupamento e codifica a ζ -globina embrionária. A grande semelhança na sequência de aminoácidos e na estrutura tridimensional da α - e ζ -globina permite concluir que os seus genes evoluíram por divergência, aproximadamente há 400 milhões de anos, a partir de um ascendente comum (Proudfoot *et al.* 1982). Relativamente aos dois genes α -globina, a sequência nucleotídica primária do gene ζ -globina tem divergido significativamente e o tamanho do seu IVS-1 aumentou significativamente (886 versus 117pb; Proudfoot *et al.* 1982). Os dois genes α -globina adjacentes, α_1 e α_2 , partilham um alto nível de homologia, o que reflete a sua evolução concertada através de uma alta frequência de conversão génica (Liebhaber *et al.* 1980; Michelson e Orkin, 1980; Orkin e Goff, 1981; Liebhaber *et al.* 1981; Higgs *et al.* 1984). A divergência entre os dois genes α -globina é limitada às sequências não-codificantes: relativamente ao gene α_1 -globina, o gene α_2 -globina contém duas substituições de um par de bases, uma deleção de 7pb no IVS-2, 18 substituições de nucleotídeos e a deleção de uma só base na região 3' não traduzida (3'NTR) (Liebhaber *et al.* 1981; Orkin e Goff, 1981). As regiões 5' destes dois genes diferem por apenas dois nucleotídeos entre o sítio de iniciação da transcrição e a posição -867 e são idênticas até à posição -633 (Michelson e Orkin, 1983).

Os três pseudogenes ($\Psi\zeta$, $\Psi\alpha_2$ e $\Psi\alpha_1$) contêm uma ou mais mutações que bloqueiam a expressão do gene. A inativação do gene $\Psi\zeta$ parece ter sido um acontecimento relativamente recente, pois ele difere do gene funcional ζ -globina adjacente, por uma só mutação sem sentido (codão 6, CAG \rightarrow TAG; Proudfoot *et al.* 1982). Os genes ζ - e $\Psi\zeta$ -globina também diferem na composição das respectivas HVRs, embora isto não pareça ter qualquer significado funcional (Higgs *et al.* 1989).

Ao contrário do pseudogene $\Psi\zeta$, os pseudogenes $\Psi\alpha_2$ e $\Psi\alpha_1$ contêm muitas mutações, que no seu conjunto silenciam a expressão do gene. O pseudogene $\Psi\alpha_1$ -globina contém uma mutação na sequência do promotor, um codão de iniciação da tradução mutado (AUG→GUG), substituições nas sequências de reconhecimento do sítio de excisão e numerosos codões sem sentido (Higgs *et al.* 1989). Há outras sequências nas vizinhanças do pseudogene $\Psi\alpha_1$, ou mesmo nele próprio, que divergem significativamente das dos genes α -globina funcionais (Proudfoot e Maniatis, 1980); nunca se identificaram *in vivo* os mRNAs de $\Psi\alpha_1$ (Whitelaw e Proudfoot, 1983).

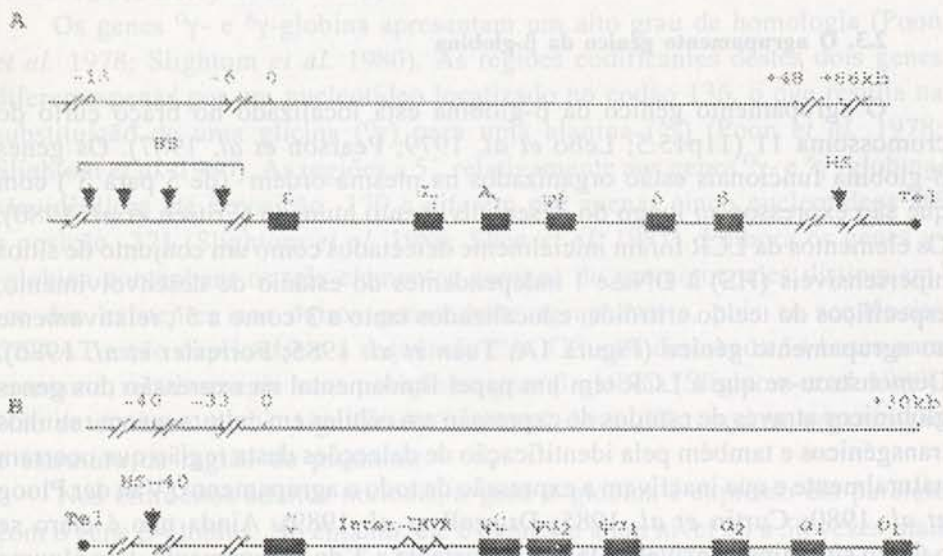


Figura 1. Representação esquemática do agrupamento gênico da β - e α -globina (A e B, respectivamente). A posição 0 representa o sítio cap do mRNA da ζ - e ϵ -globina. A posição dos genes e pseudogenes é representada por retângulos a preto, a posição da região hipervariável é representada por uma linha a zig-zag e o telômero (TeI) do cromossoma 11p (A) e do cromossoma 16p (B) é representado por um círculo a preto. A localização dos sítios hipersensíveis (HS) à DNase I, que constituem a LCR do agrupamento gênico da β -globina é representada por setas verticais. HS-40 é o sítio hipersensível à DNase I que constitui a LCR do agrupamento gênico da α -globina.

O papel funcional do gene θ_1 -globina ainda não foi determinado. Este gene parece ocupar uma posição funcional intermédia entre os genes expressos normalmente e os pseudogenes transcricionalmente silenciosos, uma vez que há evidência directa de baixos níveis de mRNA de θ_1 -globina no saco vitelino (Shaw *et al.* 1987a; Shaw *et al.* 1987b; Leung *et al.* 1987; Hsu *et al.* 1988), fígado fetal (Leung *et al.* 1987) e tecido eritróide adulto (Albitar *et al.* 1989;

Albitar *et al.* 1992a). A θ_1 -globina nunca foi detectada em qualquer estágio de desenvolvimento *in vivo*, embora os genes clonados sejam traduzidos, com baixa eficiência, em extracto de gérmen de trigo (Leung *et al.* 1989). A combinação da fraca transcrição do gene θ_1 -globina e ineficiente ou ausente tradução do mRNA da θ_1 -globina sugere que o gene θ_1 -globina tenha pouca importância no tecido eritróide e não seja essencial para o normal crescimento e desenvolvimento humanos. Consistente com estes dados é o facto de as deleções homozigóticas do gene θ_1 -globina não darem origem a alterações fenotípicas ou hematológicas (Fischel-Ghodsian *et al.* 1987b; Fei *et al.* 1988; Higgs *et al.* 1990b).

2.3. O agrupamento génico da β -globina

O agrupamento génico da β -globina está localizado no braço curto do cromossoma 11 (11p15.5; Lebo *et al.* 1979; Pearson *et al.* 1987). Os genes β -globina funcionais estão organizados na mesma ordem (de 5' para 3') com que são expressos ao longo do desenvolvimento humano (Fritsch *et al.* 1980). Os elementos da LCR foram inicialmente detectados como um conjunto de sítios hipersensíveis (HS) à DNase I independentes do estágio de desenvolvimento, específicos do tecido eritróide, e localizados tanto a 3' como a 5', relativamente ao agrupamento génico (Figura 1A; Tuan *et al.* 1985; Forrester *et al.* 1986). Demonstrou-se que a LCR tem um papel fundamental na expressão dos genes globínicos através de estudos de expressão em células em cultura ou em ratinhos transgênicos e também pela identificação de deleções desta região que ocorrem naturalmente e que inactivam a expressão de todo o agrupamento (Van der Ploog *et al.* 1980; Curtin *et al.* 1985; Driscoll *et al.* 1989). Ainda não é claro se o único sítio hipersensível à DNase I, existente a 3' do agrupamento, tem alguma importância funcional.

Existem aspectos estruturais que diferenciam os agrupamentos génicos da α - e β -globina: o agrupamento génico da β -globina apresenta um menor conteúdo em G+C (39.5% *versus* 60% para o agrupamento da α -globina; Fischel-Ghodsian *et al.* 1987c) e não contém elementos do tipo HVR. Os elementos repetitivos da família *Alu* I separam a maioria dos genes do agrupamento da β -globina (Coggins *et al.* 1981); além destes, também já foram identificados nesta região elementos repetitivos da família *Kpn* I (Shafit-Zagardo *et al.* 1982). Em geral, os genes da β -globina têm o intrão 2 consideravelmente maior que os genes tipo α -globina (850-900pb *versus* 109-149pb) e contêm sequências do promotor distintas das dos genes tipo α . Além dos elementos ATA e CCAAT que se encontram nos promotores dos genes do agrupamento da α -globina, os genes ϵ - γ - e β -globina contêm também um ou dois elementos CACCC, que se localizam aproximadamente a 100pb a montante do sítio de iniciação da trans-

crição (Law *et al.* 1980; Baralle *et al.* 1980; Slightom *et al.* 1980). Além dos elementos ATA, CCAAT e CACCC pensa-se que existam reguladores transcrpcionais negativos, ou elementos silenciadores. Estes têm sido localizados entre -177 e -392pb a 5', relativamente ao sítio de iniciação da transcrição do gene ϵ -globina (Cao *et al.* 1989) e na caixa CAAT do promotor dos genes γ -globina (Superti-Furga *et al.* 1988; Mantovani *et al.* 1989; Berry *et al.* 1992). Também há evidência que estes elementos possam ser importantes para a desactivação da expressão do gene ϵ -globina durante a passagem do período embrionário para o fetal (Lamb *et al.* 1989; Cao *et al.* 1989) e dos genes γ -globina durante a passagem da fase fetal para adulta (Superti-Furga *et al.* 1988; Mantovani *et al.* 1989; Berry *et al.* 1992).

Os genes $^{\epsilon}\gamma$ - e $^{\Lambda}\gamma$ -globina apresentam um alto grau de homologia (Poon *et al.* 1978; Slightom *et al.* 1980). As regiões codificantes destes dois genes diferem apenas por um nucleotídeo localizado no codão 136, o que resulta na substituição de uma glicina ($^{\epsilon}\gamma$) para uma alanina ($^{\Lambda}\gamma$) (Poon *et al.* 1978; Slightom *et al.* 1980). As regiões a 5', relativamente aos genes $^{\epsilon}\gamma$ - e $^{\Lambda}\gamma$ -globina, são idênticas até à posição -170 e diferem por apenas cinco nucleotídeos até à posição -371 (Slightom *et al.* 1980; Shen *et al.* 1981). Embora os genes γ -globina contenham os três elementos comuns do promotor, eles distinguem-se dos existentes nos outros genes deste agrupamento, pois as sequências CCAAT estão duplicadas e a sequência CACCC está deslocada 54 bases para montante, relativamente à sua posição no gene β -globina (Slightom *et al.* 1980). Não se conhece qual o significado funcional desta diferença na organização e estrutura da região do promotor.

Nos eritrócitos adultos normais, o gene δ -globina é expresso em paralelo com o gene β -globina. No entanto, ele é expresso a um nível 30 a 50 vezes mais baixo (Serjeant *et al.* 1978), o que pode ser devido ao facto de o promotor deste gene ser fora do comum. Ao contrário dos outros genes no agrupamento génico da β -globina, o gene δ -globina não apresenta o motivo CACCC e tem a sequência CCAAT mutada (CCAAC), a qual se localiza anormalmente perto do sítio de iniciação da transcrição (Spritz *et al.* 1980). Outros aspectos particulares deste gene incluem o facto de o IVS-2 conter uma série de pares AT e sequências poli-T próximas da extremidade 5' e segmentos de bases purínicas alternando com pirimidínicas na extremidade 3' (Spritz *et al.* 1980). Os genes δ - e β -globina diferem em 31 nucleotídeos na região codificante, e as suas proteínas diferem em 10 dos 146 aminoácidos (Law *et al.* 1980; Spritz *et al.* 1980).

O gene β -globina é o gene que está localizado na extremidade 3' do agrupamento, sendo o que apresenta maior nível de expressão em eritrócitos adultos. O seu promotor apresenta quatro elementos: ATA, CCAAT e a sequência CACCC duplicada (Law *et al.* 1990; Dierks *et al.* 1983; Myers *et*

al. 1986). A expressão completa deste gene também depende da presença de diversos elementos intensificador², incluindo um localizado a 0.6-0.9kb a jusante do sítio de poliadenilação (Trudel e Constantini, 1987; Kollias *et al.* 1987; Behringer *et al.* 1987; Donovan-Peluso *et al.* 1991) e outro no IVS-2 (LaFlamme *et al.* 1987).

O agrupamento génico da β -globina contém um só pseudogene, $\Psi\beta$, o qual está inativado por mutações nos elementos do promotor e no codão de iniciação e por diversas mutações sem sentido (Chang e Slightom, 1984).

3. O modo de expressão dos genes da globina ao longo do desenvolvimento

A expressão dos genes da globina é limitada às células eritróides e está sob estrito controlo ao longo do desenvolvimento, tendo início, em humanos, na terceira semana do desenvolvimento, nos ilhéus sanguíneos do saco vitelino embrionário (Peschle *et al.* 1985). Sob circunstâncias normais, o sítio de eritropoiese passa para o fígado fetal às 6-8 semanas pós-concepção, e depois gradualmente para a medula óssea, por volta da 28.^a semana (Peschle *et al.* 1985; Figura 2). Paralelamente a esta mudança do local de eritropoiese, há alteração na composição da própria macromolécula de hemoglobina (Figura 2). A hemoglobina embrionária, $\zeta_2\epsilon_2$ (Hb Gower-1), está presente nos eritroblastos primitivos dos ilhéus sanguíneos do saco vitelino e consiste em duas cadeias ζ -globina, que constituem a globina embrionária tipo α e duas cadeias ϵ -globina tipo β -globina (Hecht *et al.* 1966).

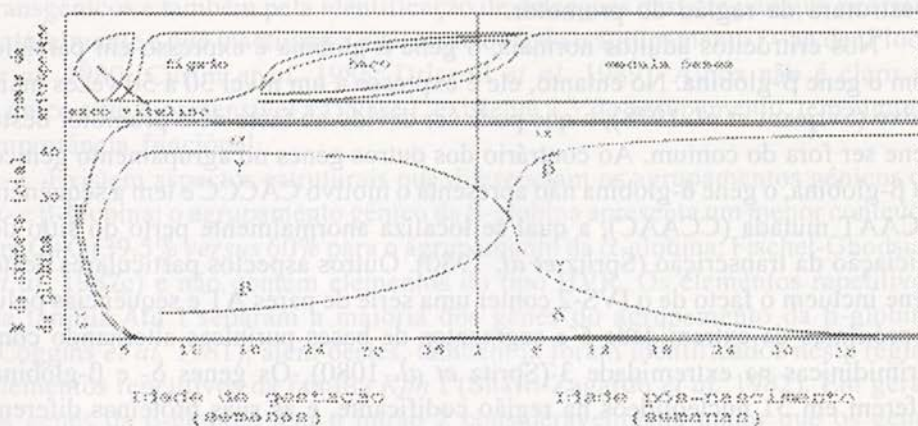


Figura 2. Representação esquemática da síntese das diferentes cadeias da globina nos vários estádios do desenvolvimento humano. O tecido no qual ocorre a eritropoiese está indicado no topo da figura. Adaptado de Weatherall e Clegg (1981).

² Tradução do termo inglês *enhancer*.

A expressão destas globinas embrionárias cessa entre as 6.^a e 8.^a semanas de gestação e é substituída pela expressão dos genes da α -globina fetal/adulta e dos genes γ -globina fetais (Huehns e Beaven, 1971). Esta comutação³ é incompleta pois, usando metodologias altamente sensíveis, podem-se detectar baixos níveis do mRNA da globina embrionária em eritrócitos de adultos normais (Albitar *et al.* 1989). A hemoglobina fetal (Hb F; $\alpha_2\gamma_2$) contém duas moléculas de α -globina e duas moléculas de γ -globina. Durante a comutação embrionária \rightarrow fetal podem formar-se ainda pequenas quantidades de outras hemoglobinas funcionais, tais como $\alpha_2\epsilon_2$ (Hb Gower-2) e $\zeta_2\gamma_2$ (Hb Portland-1) (Huehns *et al.* 1964; Gale *et al.* 1979). Todavia, a Hb F é a principal hemoglobina até ao termo da gravidez (Huehns e Beaven, 1971). A hemoglobina adulta maioritária, $\alpha_2\beta_2$ (Hb A), começa a ser detectada no fim do primeiro trimestre de gestação (7% da hemoglobina total à 6.^a semana; Kazazian e Woodhead, 1973; Cappellini *et al.* 1981). No entanto, a sua taxa é ainda muito baixa ao nascimento (10% da hemoglobina total) e não atinge o seu nível normal de expressão até aos 6-12 meses pós-nascimento (97-98% da hemoglobina total). A associação das cadeias da α -globina com δ -globina origina o tetrâmero $\alpha_2\delta_2$ (Hb A2), que corresponde a 2-3% da hemoglobina adulta.

O programa de comutação dos genes da globina ao longo do desenvolvimento e a expressão equilibrada das cadeias tipo α - e tipo β -globina podem ser alterados por uma variedade de defeitos genéticos. A perda funcional de genes α -globina, como no caso da α -talassémia, origina a expressão prolongada do gene ζ -globina, tipicamente embrionário [Hb Portland-1 ($\zeta_2\gamma_2$) e Hb Portland-2 ($\zeta_2\beta_2$); Randhawa *et al.* 1984] e a acumulação dos homotetrâmeros γ_4 (Hb Barts) e β_4 (Hb H) nos eritrócitos fetais e adultos, respectivamente. Dependendo da gravidade da deficiência da α -globina, estes tetrâmeros anormais estão ou não presentes a altos níveis; por exemplo, os níveis de Hb H podem exceder 30% da hemoglobina total em adultos com α -talassémia grave. Os tetrâmeros β_4 e γ_4 têm altas afinidades para o oxigénio, mas não apresentam uma interacção cooperativa normal entre as subunidades (Benesch *et al.* 1961; Jonxis e Huisman, 1968; Bunn e Forget, 1977) tornando-se, assim, inúteis para o transporte de O_2 , sob condições fisiológicas. A precipitação destas hemoglobinas instáveis nos eritrócitos circulantes, sob a forma de corpos de inclusão, pode diminuir significativamente a sua sobrevivência. Na β -talassémia, a deficiência de síntese da β -globina origina uma acumulação das cadeias α -globina (Kunkel *et al.* 1957). Ao contrário do que acontece com a β - e γ -globina, o excesso de monómeros α -globina não dá origem a tetrâmeros; deste modo, os monómeros precipitam na membrana dos precursores dos eritrócitos, destruindo-os (Nathan e Gunn, 1966; Yatagnas e Fessas, 1969; Wickramasinghe *et al.* 1973; Rachmilewitz *et al.* 1976).

³ Tradução do termo inglês *switching*.

4. Controlo da expressão dos genes da globina humana

Os genes das globinas humanas são expressos nos eritroblastos em diferenciação, com um modo de expressão ao longo do desenvolvimento bem preciso no tempo e geralmente irreversível. A expressão dos genes da globina é principalmente regulada ao nível da transcrição (Maniatis *et al.* 1987). Esta regulação ocorre, pelo menos em parte, através da interacção coordenada de factores transcricionais actuando em *trans* com sequências regulatórias em *cis*, as quais podem ser classificadas em promotores, intensificadores, silenciadores e/ou elementos de controlo do *locus*. Os últimos passos da síntese da globina podem ser também afectados por um ou mais controlos pós-transcricionais.

O estudo das mutações talassémicas informativas (mutações não delecionais) tem demonstrado qual a importância dos determinantes transcricionais e dos controlos pós-transcricionais, na expressão normal dos genes globínicos. Os mecanismos moleculares que são a base de muitos destes controlos têm vindo a ser elucidados com a ajuda dos mapas detalhados dos agrupamentos génicos da α - e β -globina, a completa análise de sequências dos genes e o desenvolvimento de sistemas experimentais, tais como a cultura de células *in vitro* e os ratinhos transgénicos.

4.1. Elementos de controlo da transcrição actuando em *cis*

4.1.1. As regiões de controlo dos loci

A região de controlo do *locus* correspondente ao agrupamento génico da β -globina está localizada na região 5', relativamente ao agrupamento génico (Figura 1; Tuan *et al.* 1985; Forrester *et al.* 1986). Esta região contém elementos cruciais para o alto nível de expressão dos genes β -globínicos no tecido eritróide, cuja existência foi inicialmente sugerida pela perda da expressão dos genes da β -globina numa forma delecional de β -talassémia, num doente holandês. Esta delecção (>100kb; começa a 2.5kb a 5' do gene β -globina) remove parte do agrupamento, e silencia o gene β -globina, que permanece estruturalmente intacto (Van der Ploog *et al.* 1980). O subsequente mapeamento dos sítios hipersensíveis à nuclease DNase I no agrupamento génico da β -globina revelou quatro regiões de hipersensibilidade localizadas na região a montante do agrupamento: 6.1, 10.9, 14.7 e 18kb a 5', relativamente ao sítio de iniciação da transcrição do gene ϵ -globina e um só sítio a 3', relativamente ao agrupamento, localizado a 21.8kb a jusante do sítio de poli-adenilação do gene β -globina (Tuan *et al.* 1985; Forrester *et al.* 1986). Estes sítios hipersensíveis à DNase I, designados como 5'HS1-4 e 3'HS (Orkin, 1990), são estáveis ao longo do desenvolvimento e estão presentes na cromatina eritróide em todos os estádios e desenvolvimento

(Taun et al. 1985; Forrester *et al.* 1986). Em contraste, um segundo conjunto de sítios sensíveis à DNase I está localizado na região do promotor de cada um dos genes e está presente apenas no estágio de desenvolvimento, no qual o gene está a ser expresso (Groudine *et al.* 1983).

A grande importância da β LCR *in vivo* confirmou-se pela identificação de mais duas deleções β -talassémicas que removem esta região e inativam todo o agrupamento: a deleção inglesa que atinge a zona do gene γ -globina (Curtin *et al.* 1985) e a deleção hispânica que é completamente externa ao agrupamento (-9.5 a -39kb), na qual todo o agrupamento e o sítio 5'HS1 estão intactos (Driscoll *et al.* 1989). Contrariamente à deleção hispânica, existe uma deleção de 3030pb que remove selectivamente o 5'HS1 e não exerce qualquer efeito na expressão dos genes *in cis*, mesmo no estado homocigótico (deleção alemã; Kulozik *et al.* 1991).

A função dos determinantes LCR tem sido estudada em diferentes sistemas experimentais. Têm-se feito diversas construções de mini- e micro-LCRs que contêm diferentes combinações de sítios hipersensíveis colocadas em várias posições e orientações relativamente aos genes da globina (e a genes heterólogos) de modo a estudar a sua função e determinar quais as sequências mínimas de DNA necessárias à activação génica (Ryan *et al.* 1989a; Tuan *et al.* 1989; Collis *et al.* 1990). Os resultados destes estudos não têm sido uniformes. É claro, no entanto, que embora 40% da actividade total da β LCR esteja contida num fragmento específico do elemento 5'HS2 (Ryan *et al.* 1989a; Tuan *et al.* 1989; Collis *et al.* 1990), para que se atinga o nível total de actividade, é necessário a adição dos segmentos 5'HS3 e 5'HS4 (Ryan *et al.* 1989a; Tuan *et al.* 1989). Estas experiências também sugerem que a LCR deve ter duas funções distintas: activador da cromatina e intensificador transcricional. A função como activador da cromatina consiste na «abertura» da cromatina adjacente de forma a facilitar o acesso de factores actuando *in trans*, a sítios específicos no DNA (Forrester *et al.* 1990). Os genes que tenham sido activados pela LCR são caracterizados pelo baixo nível de metilação e por um generalizado aumento de sensibilidade à DNase I (embora não com a mesma intensidade que a própria LCR; Yagi *et al.* 1986). Esta actividade da LCR parece ser independente da orientação e da distância (Grosveld *et al.* 1987; Van Assendelf *et al.* 1989; Talbot *et al.* 1989; Ryan *et al.* 1989b; Epner *et al.* 1990); na configuração nativa a β LCR está localizada a mais de 60kb do gene β -globina (Tuan *et al.* 1985; Forrester *et al.* 1986) e em sistemas experimentais ela pode activar sequências de DNA localizadas a distâncias superiores a 150kb (Epner *et al.* 1990). Embora se verifiquem estas situações, não há evidência que a β LCR active genes localizados fora do agrupamento génico da β -globina.

O elementos na β LCR também podem actuar como intensificadores transcricionais clássicos (Tuan *et al.* 1989; Ney *et al.* 1990a). Na verdade, é difícil

fazer uma clara distinção entre a função de intensificador da LCR e a sua função de activador da cromatina, em sistemas experimentais onde a LCR e os genes dependentes são integrados na cromatina do hospedeiro. Nestes casos, são os dois tipos de actividade que originam um aumento transcricional do transgene. Um modo de estudar estas duas funções independentemente, consiste em fazer a transfecção de células em cultura com expressão transitória. Neste caso, os genes transfectados são expressos num estado epissomal e como tal não estão sujeitos a efeitos de integração na cromatina. Usando estes ensaios de expressão em estado transitório, o sítio 5'HS2 parece ter, particularmente, uma alta actividade intensificador, específica do tecido eritróide (Tuan *et al.* 1987; Tuan *et al.* 1989; Ney *et al.* 1990b). O 5'HS1 e 3 exibem baixas actividades em ensaios semelhantes (Tuan *et al.* 1987).

A expressão dos genes do agrupamento da α -globina parece ser regulada também por uma LCR localizada a 40kb a 5' do gene ζ -globina (Higgs *et al.* 1990a; Jarman *et al.* 1991). Tal como com a LCR do agrupamento β -globina, esta região foi posta em evidência por uma deleção que ocorreu naturalmente e que está associada a um fenótipo talassémico. Esta deleção remove uma região a montante dos genes da α -globina que estão funcionalmente inactivos (Hatton *et al.* 1990). Foram subsequentemente descritas mais quatro deleções, todas elas removendo segmentos variáveis a 5' do agrupamento génico e inactivando a expressão dos genes α -globina (Wilkie *et al.* 1990; Liebhaber *et al.* 1990; Romão *et al.* 1991; Romão *et al.* 1992). A intersecção destas deleções, desde -30 a -50kb a 5' do agrupamento, permitiu identificar um segmento que contém elemento(s) que activa(m) a expressão génica. O mapeamento da cromatina do tecido eritróide para a sensibilidade à DNase I, evidenciou um conjunto de sítios hipersensíveis nesta região, localizados a -33 e -40kb, a 5' do gene ζ -globina (Higgs *et al.* 1990a; Jarman *et al.* 1991). A importância do elemento localizado a -40kb foi confirmado em estudos de expressão em células eritróides em cultura, os quais apresentaram uma activação transcricional total num fragmento de 350pb que contém este sítio (Jarman *et al.* 1991; Zhang *et al.* 1993). A sequência desta região e os seus motivos correspondentes aos sítios de ligação a factores actuando em *trans* mostraram uma grande semelhança, relativamente à região 5'HS2 da β LCR (Jarman *et al.* 1991). Por esta razão, esta região tem sido referida como α LCR. Um importante aspecto de distinção entre ambas as LCRs é, no entanto, a incapacidade da α LCR activar os transgenes α -globina ao seu nível máximo. Outro ponto de interesse é o facto de a α LCR se localizar no intrão de um gene não eritróide orientado no sentido oposto ao dos genes do agrupamento da α -globina (Vyas *et al.* 1992).

O estudo da localização dos elementos da β LCR (5'HS1-4) e da α LCR (HS-40) mostrou que cada um deles consiste num fragmento de DNA de 200-

-300pb que contém sítios de ligação para vários factores transcricionais eritróides e ubiqúitários, *in vitro* (Philipsen *et al.* 1990; Talbot *et al.* 1990; Jarman *et al.* 1991; Pruzina *et al.* 1991; Talbot e Grosveld, 1991) e *in vivo* (Ikuta e Kan, 1991; Reddy e Shen, 1991; Strauss *et al.* 1992; Strauss e Orkin, 1992; Zhang *et al.* 1993).

4.1.2. Elementos do promotor

As sequências do promotor localizados a montante de todos os genes do agrupamento da α - e β -globina ligam-se a factores actuando em *trans*. Alguns destes factores são de importância geral pois fazem parte de complexos transcricionais (Breathnach e Chambon, 1981) enquanto outros promovem especificamente a expressão dos genes das globinas, em células eritróides (Dierks *et al.* 1983; Myers *et al.* 1986). As sequências no promotor incluem os motivos ATA e CCAAT, localizados a aproximadamente 30 e 70pb a 5' do sítio de iniciação da transcrição, respectivamente (Breathnach e Chambon, 1981). Todos estes elementos são reconhecidos por factores transcricionais ubiqúitários, embora também possa haver factores específicos do estágio de desenvolvimento e/ou do tecido, que se liguem a estas sequências. Os promotores globínicos também incluem o sítio de reconhecimento WGATAR (W representa A ou T e R representa A ou G), para o factor transcricional eritróide GATA-1. No entanto, este motivo não está presente no promotor da α -globina humana. Alguns elementos podem influenciar a eficiência da transcrição de um modo específico do estágio de desenvolvimento e/ou do tecido.

Além dos promotores, existem outras sequências localizadas no gene globínico ou perto deste, que podem também alterar a sua expressão. Estas sequências comportam-se como intensificadores (Behringer *et al.* 1987; Bodine e Ley, 1987; Kollias *et al.* 1987; Trudel e Costantini, 1987) ou elementos regulatórios negativos (Cao *et al.* 1989; Watt *et al.* 1990), em sistemas experimentais de expressão génica transitória.

A análise mutacional das regiões do promotor do gene β -globina permitiu identificar uma terceira sequência (CACCC), localizada a aproximadamente 100pb a 5' do sítio cap da β -globina. Esta sequência é conservada em todos os genes do tipo β -globina, em ratinhos, cabras, coelhos e humanos, em uma ou duas cópias, com excepção do gene δ -globina humano que é expresso a baixo nível (Dierks *et al.* 1983). Este motivo também não está presente nas regiões do promotor dos genes do agrupamento da α -globina.

Os elementos do promotor dos genes da globina são, eles próprios, suficientes para a programação de uma apropriada expressão específica do tecido eritróide, e, em alguns casos, do estágio de desenvolvimento. Por exemplo, a

introdução do gene β -globina humano no genoma do ratinho dá origem a uma expressão específica do tecido eritróide e limitada ao período fetal/adulto. Todavia, o nível de expressão dos transgenes β -globina é apenas uma pequena percentagem da expressão dos genes β -globina endógenos do ratinho, sendo o nível exacto de expressão altamente variável entre diferentes linhas de ratinhos transgénicos (Chada *et al.* 1986; Behringer *et al.* 1987). A introdução da LCR adjacente ao transgene β -globina faz com que esta baixa e variável expressão seja ultrapassada. Quando se testam, em ratinhos transgénicos, construções tais como β LCR/ β -globina, o transgene β -globina é expresso, reprodutivelmente, ao mesmo nível que o mRNA endógeno da β -globina (Grosveld *et al.* 1987; Van Assendelft *et al.* 1989; Talbot *et al.* 1989). No entanto, há uma interessante excepção, que consiste no facto de a ligação directa da LCR aos genes γ - ou β -globina resultar na perda do controlo da expressão durante o desenvolvimento. A expressão apropriada a cada estágio de desenvolvimento é, todavia, restabelecida quando os dois genes são ligados à LCR na sua ordem nativa (5'-LCR- γ - β -3'; Enver *et al.* 1990; Behringer *et al.* 1990; Hanscombe *et al.* 1991). Estes dados sugerem que a apropriada regulação, ao longo do desenvolvimento, dos genes γ - e β -globina pode depender da organização do agrupamento e de determinantes transcricionais específicos do estágio de desenvolvimento e do tecido que possivelmente possam actuar com o promotor destes genes (Choi e Engel, 1988; Enver *et al.* 1990; Behringer *et al.* 1990; Hanscombe *et al.* 1991).

4.1.3. A expressão dos genes duplicados α -globina

Os genes α -globina são codificados por dois *loci* adjacentes e duplicados (Liebhaber, 1989). A expressão relativa dos dois *loci* α -globina co-expressos foi difícil de determinar pois os dois genes codificam α -globinas idênticas (Liebhaber *et al.* 1980; Michelson e Orkin, 1980; Liebhaber *et al.* 1981; Orkin e Goff, 1981). A observação de que os mRNAs da α_1 - e α_2 -globinas diferem na sequência 3' não-traduzida (Michelsen e Orkin, 1980; Liebhaber *et al.* 1980; Liebhaber *et al.* 1981), permitiu detectar e quantificar diferencialmente o nível de mRNA em estado estacionário, dos dois *loci* α -globina. Estes estudos demonstraram que a razão do mRNA α_2 -globina: α_1 -globina é aproximadamente 2.6:1 no tecido eritróide fetal (Orkin e Goff, 1981), na medula óssea adulta (Liebhaber e Kan, 1981) e em reticulócitos adultos (Orkin e Goff, 1981; Liebhaber e Kan, 1981; Liebhaber *et al.* 1985; Liebhaber *et al.* 1986). Recentemente, demonstrou-se que antes da total activação da expressão da α -globina às 6 semanas após concepção, a expressão dos dois *loci* α -globina é equivalente (Albitar *et al.* 1992b), o que indica, que ao longo do desenvolvimento, ocorre uma alteração na expressão relativa dos dois genes α -globina.

O facto de o gene α_2 -globina ser expresso 2.6 vezes mais do que o gene α_1 -globina e de ambos os mRNAs apresentarem a mesma eficiência traducional implica que o *locus* α_2 -globina codifique a maioria da proteína α -globina (Shakin e Liebhaber, 1986). Este conhecimento permitiu clarificar a relação entre o fenótipo e o genótipo nas α -talassémias. Mutações não-deleccionais no *locus* α_2 -globina originam um menor nível de α -globina e um fenótipo mais grave do que mutações semelhantes no *locus* α_1 -globina (Pirastu *et al.* 1984; Moi *et al.* 1987). Todavia, as mutações deleccionais que fisicamente removem o gene α_2 -globina têm um efeito menos grave do que defeitos não deleccionais neste *locus* (Paglietti *et al.* 1986) pois, pelo menos na deleção $-\alpha^{3.7}$ (Orkin *et al.* 1979), ocorre um aumento compensatório da expressão do gene α_1 -globina que permanece nesse cromossoma (Liebhaber *et al.* 1985). No entanto, o mecanismo envolvido nesta resposta transcricional ainda não é conhecido. O efeito desta deleção é, assim, intermediário entre o efeito da perda não-deleccional de um gene α_2 -globina (grave) e a perda de um gene α_1 -globina por um mecanismo deleccional ou um defeito não-deleccional (suave; ver Tabela I; Liebhaber, 1989).

TABELA I

Efeito das mutações α -talassémicas na síntese da α -globina. Uma unidade de síntese é definida como a expressão do gene α_1 -globina. α^T é o símbolo genérico para qualquer mutação α -talassémica não-deleccional (Liebhaber, 1989).

Cromossoma	genótipo	Unidades de síntese da α -globina
$-\alpha_2-\alpha_1-$	$\alpha\alpha$	$2.6+1.0=3.6$
$-\alpha_2-\alpha^T-$	$\alpha\alpha^T$	$2.6+0.0=2.6$
$-(3.7\text{kb})-\alpha_1-$	$-\alpha^{3.7}$	$0.0+1.8=1.8$
$-\alpha^T-\alpha_1-$	$\alpha^T\alpha$	$0.0+1.0=1.0$

4.2. Factores actuando em *trans*

Os factores envolvidos na regulação da expressão dos genes globínicos podem ser divididos em três categorias: factores de transcrição gerais envolvidos na formação do complexo de pré-iniciação na caixa ATA, factores específicos do tecido eritróide que podem influenciar a expressão dos genes globínicos independentemente do estágio de desenvolvimento e factores que se pensa estarem envolvidos na regulação da expressão génica ao longo do desenvolvimento. A actividade transcricional dos genes da globina, tal como de outros genes específicos de tecido, é dependente da acção combinada dos factores ubiqüitários e dos factores específicos (Evans *et al.* 1990; deBoer *et al.* 1988; Talbot e Grosveld, 1991; Yu *et al.* 1991).

Presentemente, conhecem-se oito factores transcricionais específicos do tecido eritróide e que estão envolvidos na regulação da expressão dos genes das globinas. Destes, o factor mais bem caracterizado é GATA-1. Este factor (também conhecido por NF-E1, Eryf1 e GF-1; Wall *et al.* 1988; Evans *et al.* 1988; Martin *et al.* 1989) é altamente conservado na evolução, sendo expresso no tecido eritróide de humanos (Zon *et al.* 1990; Trainor *et al.* 1991), ratinhos (Tsai *et al.* 1989; Tsai *et al.* 1991) e galinhas (Evans *et al.* 1988; Evans e Felsenfeld, 1989; Hannon *et al.* 1991). Os clones de cDNA de GATA-1 indicam uma proteína de 49kD, a qual contém dois conjuntos de dupletes de dedos de zinco e ainda um número de outros motivos de grande importância para a sua ligação ao DNA e activação transcricional (Zon *et al.* 1990). Possivelmente, GATA-1 actua como um activador da transcrição específico do tecido, através de interacções com componentes da maquinaria transcricional basal. Sob determinadas circunstâncias, GATA-1 poderá também actuar por remoção de um regulador negativo da expressão globínica (Rahuel *et al.* 1992). Embora GATA-1 seja essencial para o desenvolvimento eritróide, conhece-se relativamente pouco sobre as suas interacções com outras proteínas que cooperam para activar a expressão dos genes eritróides, para mediar a função dos elementos da LCR ou para ocasionar a comutação dos genes das globinas durante o desenvolvimento. No entanto, sabe-se que o sítio de reconhecimento para GATA-1 [(T/A)GATA(A/G)] está presente nas regiões do promotor dos genes das globinas (Perkins *et al.* 1989; Gatala *et al.* 1989), nas LCRs dos agrupamentos da α - e β -globina (incluindo o importante 5'HS2 do agrupamento da β -globina; Orkin, 1990; Talbot e Grosveld, 1991; Pruzina *et al.* 1991) e numa variedade de genes não-globínicos específicos do tecido eritróide (Brady *et al.* 1989; Mignotte *et al.* 1989; Vignal *et al.* 1990). Os sítios de ligação a GATA-1 estão frequentemente sobrepostos ou adjacentes a outras sequências reguladoras da transcrição, em particular, as sequências CACCC do promotor, comuns à maioria dos genes do agrupamento da β -globina (Orkin, 1990). O motivo ATA dos genes da globina possivelmente também constitui um sítio de ligação para GATA-1 (Orkin, 1990).

É de interesse salientar que GATA-1 é membro de uma grande família de proteínas de ligação, GATA (GATA-2, GATA-3, GATA-4) que se expressam no tecido eritróide e não-eritróide (Yamamoto *et al.* 1990; Orkin, 1992). GATA-2 e GATA-3 conservam os mesmos domínios de dedos de zinco de ligação ao DNA, mas divergem significativamente fora destas regiões (Yamamoto *et al.* 1990). É de notar que os genes GATA-2 e GATA-3 são activos em alguns tecidos não eritróides (Yamamoto *et al.* 1990). Pensa-se que o seu défice possa originar síndromas talassémicos não ligados aos agrupamentos génicos das globinas (Murru *et al.* 1992; Peres *et al.* 1993a).

Parece haver mais três factores de transcrição com distribuição limitada pelos tecidos e que contribuem para a expressão dos genes globínicos. Um destes factores é o NF-E2 que se liga à mesma sequência de reconhecimento que o factor AP-1 (Bohmann *et al.* 1987; Mignotte *et al.* 1989). Dois destes motivos de reconhecimento AP-1/NF-E2 estão igualmente localizados nos 5'HS2 e 5'HS3 da LCR da β -globina e no HS-40 (Talbot *et al.* 1990; Ney *et al.* 1990a; Talbot e Grosveld, 1991).

Os elementos do promotor dos genes da globina também apresentam sítios de ligação para um número de proteínas transcricionais constitutivas. O factor de transcrição PolII (TFIID) liga-se ao elemento ATA (Parker e Topol, 1984; VanDyke *et al.* 1988) e pelo menos cinco factores distintos podem ligar-se ao elemento CCAAT [CCAAT binding proteins (CBPs)]. No entanto, parece que a proteína ubiquitária CP1 é aquela que se liga com maior afinidade aos promotores dos genes α -, β - e γ -globina humana (Chodosh *et al.* 1988; de Boer *et al.* 1988; Gumucio *et al.* 1988; Superti-Furga *et al.* 1988), CP2 parece ligar-se preferencialmente ao promotor do gene ζ -globina (Yu *et al.* 1990) e o factor Sp-1 liga-se a diversas regiões do promotor de muitos genes da globina (Whitelaw *et al.* 1989a; Yu *et al.* 1990; Yu *et al.* 1991).

No que diz respeito aos factores que medeiam a expressão específica do estágio de desenvolvimento dos genes da globina humana, pouco se sabe. No entanto, há evidência de uma possível proteína repressora (BP1) que se liga a uma região regulatória negativa, localizada entre -610 e -490 pb a montante do gene da β -globina (Eliott *et al.* 1992).

4.3. Interações entre a β LCR, os genes tipo β e os seus factores de transcrição

Quando um gene β -globina se liga à β LCR (ou parte desta) e se obtém um ratinho transgénico com este fragmento, o transgene apresenta um nível de expressão que é independente do seu sítio de integração no genoma, mas dependente do número de cópias. Pensa-se que o facto da expressão do transgene se tornar independente do seu sítio de integração seja devido à β LCR activar a sua transcrição, pelo estabelecimento de interações estáveis entre a β LCR e os genes. No entanto, os efeitos de posição não se observam quando se obtêm baixos níveis de expressão devido, por exemplo, a promotores ineficientes (Dillon e Grosveld, 1991). Assim, pensa-se que há factores proteicos que são necessários para a estabilidade do complexo β LCR-promotor. Em particular, pensa-se que o factor transcricional SP1 (Philipsen *et al.* 1993) tenha um importante papel na activação transcricional, específica do tecido eritróide, uma vez que ele apresenta capacidade de «formar» ansas de DNA (Li *et al.* 1991; Mastrangelo *et al.* 1991; Su *et al.* 1991), um processo importante para a activação génica em geral, e para as interações entre a β LCR e os genes das globinas, em particular (Hanscombe *et al.* 1991).

A principal actividade da β LCR está associada aos H2, HS3 e HS4 (Forrester *et al.* 1989; Ryan *et al.* 1989a; Tuan *et al.* 1989; Collis *et al.* 1990; Fraser *et al.* 1990; Lowrey *et al.* 1992; Fraser *et al.* 1993). Nestes três sítios há diversas sequências para a ligação de factores transcricionais, tais como GATA-1. A deleção dos sítios de ligação para GATA-1 no promotor, impede a indução do gene β -globina, específica do tecido do eritróide (deBoer *et al.* 1988). Embora GATA-1 tenha propriedades de activador transcricional (Martin e Orkin, 1990) a presença dos sítios de ligação a GATA-1 *per se* não é suficiente para se obter uma expressão independente da sua posição no genoma. Assim, as regiões de flanco do gene β -globina humano, as quais contêm, pelo menos, seis sítios de ligação a GATA-1 (deBoer *et al.* 1988; Wall *et al.* 1988), não conferem uma expressão do gene β -globina independente do sítio de integração no genoma (Magram *et al.* 1985; Townes *et al.* 1985; Kollias *et al.* 1986). Experiências em ratinhos transgênicos, utilizando o HS3 indicam que a combinação mínima necessária para uma expressão génica independente da posição, envolve a presença de dois sítios GATA-1 flanqueando um motivo rico em Gs (Philipsen *et al.* 1993). O motivo rico em Gs do HS3 humano liga-se eficientemente, *in vitro*, ao factor transcricional Sp1.

Da análise funcional detalhada do HS2 obtém-se um resultado diferente. Experiências de transfecção celular com expressão em estado transitório, mostram que existe uma actividade intensificador clássica associada apenas a este sítio (Tuan *et al.* 1989; Ney *et al.* 1990a,b). A análise fina do HS2 mostrou que há várias proteínas que se ligam a um fragmento central de cerca de 300pb, que contém este sítio (Talbot *et al.* 1990). No entanto, a sequência duplicada consensual para a família jun/fos é a crucial para a actividade do HS2 (Talbot *et al.* 1990; Ney *et al.* 1990b). O activador funcional que interactua com o sítio jun/fos parece ser NF-E2. Todavia, a presença desta sequência duplicada, só por si, não é suficiente para originar altos níveis de expressão (Talbot *et al.* 1990). Por outro lado, quando o sítio de ligação jun/fos é removido do fragmento de 300pb, HS2 retém a capacidade de activar um gene β -globina a ele associado, de um modo dependente do número de cópias, mas a baixos níveis (Talbot e Grosveld, 1991). Assim, conclui-se que embora a região NF-E2 do HS2 tenha uma forte actividade intensificador (Ney *et al.* 1990a,b) e seja importante para a obtenção de altos níveis de expressão do gene globínico, não parece ser necessária para uma activação do gene globínico independentemente da posição de integração.

4.4. Interação entre o HS-40, os genes tipo α e os seus factores transcricionais

O elemento regulatório HS-40 da α -globina parece ter funções no agrupamento génico da α -globina, semelhantes às do β LCR no agrupamento génico

da β -globina. Em ratinhos transgênicos, o HS-40 confere altos níveis de expressão aos genes tipo α a ele associados, de um modo específico do tecido eritróide (Higgs *et al.* 1990a; Jarman *et al.* 1991; Sharpe *et al.* 1992).

A actividade do HS-40 foi localizada num fragmento de 350pb, o qual contém sítios para as proteínas GATA-1, NF-E2 e CACC (Jarman *et al.* 1991; Strauss *et al.* 1992). O padrão de ligação das proteínas ao HS-40, *in vivo* e *in vitro*, é semelhante ao de HS2 da β LCR e ambas as regiões se comportam como intensificadores típicos, específicos do tecido eritróide, em estudos de expressão em estado transitório (Tuan *et al.* 1989; Zhang *et al.* 1993).

A actividade de HS-40, específica do tecido eritróide em células transfectadas em estado transitório, é dependente dos dois sítios NF-E2 localizados na sequência central e também das sequências GATA-1 e caixa CACC, localizadas à volta desses motivos, embora em menor grau. Demonstrou-se já, a existência de proteínas específicas do tecido eritróide que se ligam a cada um destes sítios (Strauss *et al.* 1992; Zhang *et al.* 1993).

Têm sido observadas algumas diferenças entre as construções HS-40/ α -globina e β LCR/ β -globina, em ratinhos transgênicos. Em particular, com as construções HS-40/ α -globina não se tem observado uma estreita dependência entre o número de cópias génicas e o nível de expressão e para além disso, parece que a expressão do gene α -globina humano decresce duas a três vezes ao longo do desenvolvimento murino (Sharpe *et al.* 1992). As razões para estas diferenças não são ainda claras e ainda não se sabe se o HS-40 é suficiente para uma total regulação do agrupamento génico da α -globina humana, pois existem outros sítios hipersensíveis à DNase I, localizados entre o HS-40 e o agrupamento génico da α -globina (Jarman *et al.* 1991). No entanto, eles por si só, não são capazes de o activar. Por outro lado, quando estes sítios são adicionados ao HS-40, o nível de expressão do gene α -globina, a eles associado, não aumenta, o que pode indicar que existem outras regiões do genoma necessárias para a expressão dos genes α -globina.

4.5. Regulação ao longo do desenvolvimento dos genes do agrupamento da β - e α -globina humana em ratinhos transgênicos

Quando, em ratinhos transgênicos, se estudou a regulação ao longo do desenvolvimento, dos genes tipo β , individualmente e na ausência de β LCR, verificou-se que o gene ϵ -globina era inactivo (Shih *et al.* 1990), mas os genes γ - e β -globina eram expressos de um modo específico do desenvolvimento, embora a baixo nível e dependendo da posição de integração no genoma (Magram *et al.* 1985; Townes *et al.* 1985; Chada *et al.* 1986; Kollias *et al.* 1986). Quando se realizou o mesmo estudo, mas ligando a β LCR a cada um dos genes, o gene

ϵ -globina era expresso apenas na fase embrionária do desenvolvimento murino (Raich *et al.* 1990; Shih *et al.* 1990; Fraser *et al.* 1993). O gene γ -globina, tal como o seu gene homólogo murino, o gene β h1-globina, era expresso no saco vitelino embrionário. Todavia, ao contrário do gene β h1-globina, o gene γ -globina era expresso no fígado fetal, sendo apenas silenciado após o dia 16 do desenvolvimento murino, não sendo expresso na fase adulta (Dillon e Grosveld, 1991). O gene β -globina individualmente ligado à β LCR, é expresso prematuramente, nas células embrionárias em diferenciação, embora a um baixo nível. Tal como o gene β -globina murino, o gene β -globina humano é expresso a altos níveis no fígado fetal e em reticulócitos do adulto (Grosveld *et al.* 1987; Blom van Assendelft *et al.* 1989; Enver *et al.* 1990; Behringer *et al.* 1990). Isto sugere que a regulação destes genes, ao longo do desenvolvimento depende em algum grau, das regiões que flanqueiam os genes. Todavia, é claro que a β LCR não é neutra deste ponto de vista, e que também influencia o padrão de expressão dos genes.

Com base nestes dados, o modelo mais simples indica para a existência de supressores da expressão génica, específicos do estágio do desenvolvimento (Dillon e Grosveld, 1991). De acordo com este modelo, a β LCR pode interagir com cada um dos genes em qualquer estágio do desenvolvimento, mas interage preferencialmente com o gene ϵ -globina no saco vitelino. Quando a interacção é reprimida por supressores específicos do estágio de desenvolvimento, no fígado fetal, a β LCR interage preferencialmente com os genes γ -globina, os quais, por seu turno, estão suprimidos na fase adulta. Parece haver, pelo menos, dois sítios de ligação a estes supressores, um na região do promotor do gene ϵ -globina (Cao *et al.* 1989) e diversos na caixa CAAT distal no promotor dos genes γ -globina (Superti-Furga *et al.* 1988; Mantovani *et al.* 1989; Berry *et al.* 1992). Todavia, este modelo não explica como é que os genes γ - e β -globina estão silenciosos nas primeiras fases do desenvolvimento eritróide humano. Os resultados das experiências em ratinhos transgénicos que contêm combinações de transgenes, sugerem um mecanismo de competição entre os genes para a β LCR.

No que diz respeito aos genes do agrupamento da α -globina humana, o gene ζ -globina não é expresso a níveis detectáveis em ratinhos transgénicos, na ausência da LCR ou parte desta. Todavia, quando se liga um gene ζ -globina à β LCR ou ao HS-40, o gene ζ -globina é expresso a altos níveis e regulado de um modo específico do estágio do desenvolvimento (Spangler *et al.* 1990; Albitar *et al.* 1991). Existe evidência para que a regulação ao longo do desenvolvimento possa estar relacionada com um fragmento de 550pb de DNA, o qual inclui o promotor do gene ζ -globina. A presença ou ausência dos genes α -globina em *cis* com o gene ζ -globina parece não influenciar o padrão de expressão (Spangler *et al.* 1990). De igual modo, os genes α -globina ligados

à β LCR ou ao HS-40 são apropriadamente regulados ao longo do desenvolvimento, em ratinhos transgênicos, independentemente de estarem em *cis* com o gene ζ -globina (Albitar *et al.* 1991; Sharpe *et al.* 1992).

Um estudo posterior da expressão dos genes do agrupamento da α -globina humana ao longo do desenvolvimento, em ratinhos transgênicos que continham ou os genes α - e ζ -globina humana ou genes híbridos entre o promotor (p) de um destes genes e o corpo do outro gene (g) globínico ($\alpha_p\zeta_g$ e $\zeta_p\alpha_g$), teve como objectivo, testar se as sequências necessárias à regulação génica ao longo do desenvolvimento estão apenas contidas no promotor, ou se essa regulação é também dependente da interacção com elementos do corpo do próprio gene da globina que possam ser comuns aos dois genes. Para testar esta segunda hipótese, fez-se uso de ratinhos com transgenes híbridos constituídos pelos promotores dos genes globínicos associados a um gene repórter não eritróide [gene da hormona humana de crescimento; GH (α_pGH_g e ζ_pGH_g)]. Destes estudos, obteve-se informação sobre os elementos actuando em *cis* envolvidos no controlo da expressão do agrupamento génico da α -globina humana ao longo do desenvolvimento. Assim, os resultados obtidos com os transgenes α - e ζ -globina, os quais apresentavam um padrão de expressão, em ratinhos transgênicos, semelhante ao dos genes α - e ζ -globina murinos, respectivamente, indicam que os fragmentos de DNA contendo estes genes, apresentam as sequências necessárias e suficientes para uma adequada expressão ao longo do desenvolvimento murino. Os resultados obtidos com o transgene ζ_pGH_g , o qual apresenta um padrão de expressão, em ratinhos transgênicos, que é semelhante ao do gene ζ -globina murino, indica que o promotor do gene ζ -globina humana contém toda a informação necessária para uma adequada expressão deste gene ao longo do desenvolvimento. Por outro lado, os resultados obtidos dos transgenes $\alpha_p\zeta_g$ - e $\zeta_p\alpha_g$ -globina, os quais apresentam um padrão de expressão, em ratinhos transgênicos, semelhante ao do gene α -globina murino, indicam que tanto o promotor da α -globina humana como o corpo do próprio gene contém sequências que estão envolvidas na regulação da sua expressão. Além disso, parece que as sequências contidas no corpo do gene α -globina humana, envolvidas na regulação da expressão deste gene, ao longo do desenvolvimento, apresentam um efeito sobre o controlo da expressão génica, que se sobrepõe ao efeito das sequências contidas no promotor do gene ζ -globina humana, pois o transgene ζ_pGH_g exprime-se principalmente na fase embrionária do desenvolvimento murino, mas os transgenes $\alpha_p\zeta_g$ - e $\zeta_p\alpha_g$ -globina exprimem-se predominantemente na fase fetal/adulta do desenvolvimento murino (Romão, 1994).

O facto de o gene ζ -globina ser regulado autonomamente pode estar relacionado com a presença de factores transcricionais actuando positivamente, os quais são produzidos apenas nos eritroblastos da linha primitiva. Alternadamente, o controlo pode resultar do aparecimento nos eritroblastos da linha

definitiva de factores regulatórios negativos que reprimem os genes embrionários.

4.6. Competição dos genes das globinas humanas para a LCR em ratinhos transgênicos

A competição entre os genes globínicos para a LCR tornou-se aparente quando se usaram combinações de genes globínicos para obter ratinhos transgênicos. Assim, a expressão prematura do gene β -globina quando ligado à β LCR, e expresso em ratinhos transgênicos, pode ser anulada, pela competição para a β LCR, do gene γ - e α -globina (Behringer *et al.* 1990; Enver *et al.* 1990; Hanscombe *et al.* 1991). Esta competição parece funcionar dependendo da polaridade, o que faz com que o gene que é proximal à β LCR esteja em vantagem relativamente ao gene distal (Hanscombe *et al.* 1991).

Por outro lado, um outro mecanismo explicativo pode ser a frequência de contacto entre os genes e a β LCR (Hanscombe *et al.* 1991). Assim, durante a fase fetal, a interacção dos genes γ -globina com a β LCR seria mais frequente do que a do gene β -globina e, devido à acção de factores específicos do estágio, devia ser também mais forte. A combinação destes dois parâmetros permitiria que os genes γ -globina competissem com o gene β -globina. Na fase adulta, embora o gene β -globina apresentasse uma interacção mais forte com a β LCR, a sua muito mais baixa frequência de contacto tornaria difícil a competição com um gene γ -globina que apresentasse uma forte capacidade de formar tais interacções. É possível que este efeito seja obtido por uma forte interacção β , mas não parece provável que isto esteja envolvido especificamente no silenciamento do gene γ -globina. O mecanismo alternativo mais provável será um em que o silenciamento dos genes das primeiras fases de desenvolvimento, é mediado pelos promotores desses genes através de factores específicos do estágio de desenvolvimento.

4.7. A especificidade dos elementos da β LCR ao longo do desenvolvimento

O facto de a β LCR influenciar o padrão de expressão dos genes durante o desenvolvimento, por competição, sugere que não é possível interactuar e estimular simultaneamente a transcrição de vários genes. Isto pode ser explicado se os elementos HS individuais interagirem entre si para formar um grande complexo, o qual interage com os genes. Tal mecanismo sugere que os sítios HS individuais podem ter uma diferente especificidade ao longo do desenvolvimento e que os genes competem para um elemento específico, num grande

complexo, num dado estágio do desenvolvimento. Para estudar se as regiões individuais hipersensíveis interagem diferencialmente com os genes e se cada uma das regiões apresenta uma diferente especificidade ao longo do desenvolvimento, obtiveram-se construções com cada um dos sítios hipersensíveis em combinação com os genes γ - e β -globina humanos, e obtiveram-se ratinhos transgênicos. Determinou-se, assim, o padrão de expressão dos diferentes genes ao longo do desenvolvimento (Fraser *et al.* 1993). Os resultados mostraram que os sítios individuais se comportam diferencialmente com o gene γ - e β -globina, o que tem implicações para o mecanismo da função da LCR e mostra que a β LCR não é neutra ao longo do desenvolvimento. Em relação ao HS3, este é o único sítio que é capaz de dirigir a expressão do gene γ -globina no fígado fetal, sugerindo que este sítio é a parte da β LCR para a qual os genes γ - e β -globina competem durante o estágio fetal. Já que todos os outros sítios são capazes de dirigir a expressão do gene β -globina durante este período, este resultado também indica que os elementos da β LCR podem interagir entre si, para formar um grande complexo que interage com os genes. O HS4 é o sítio mais activo na expressão da β -globina na vida adulta, o que indica que é ele que forma a interacção mais estável com este gene na fase adulta (Fraser *et al.* 1993). Assim, parece ocorrer uma comuta do HS3 para o HS4 na comutação fetal \rightarrow adulta sendo o promotor γ capaz de formar complexos estáveis com o HS3 mas não com o HS4.

Em conclusão, os dados sugerem que a β LCR deve actuar através da formação de uma ansa contendo os seus elementos e originando um grande complexo, o qual interage com os genes. O padrão de expressão do agrupamento génico da β -globina, ao longo do desenvolvimento, é regulado a diferentes níveis. O mais importante é a acção de factores regulatórios, específicos do estágio, nas sequências que flanqueiam imediatamente os genes e possivelmente a β LCR. Este mecanismo envolve um número de parâmetros que incluem a distribuição espacial dos genes relativamente à β LCR e a estabilidade das interacções entre os promotores e cada um dos sítios hipersensíveis.

4.8. Controlo pós-transcricional da expressão dos genes da globina

O processamento pós-transcricional normal dos transcritos primários dos genes da globina envolve a adição da estrutura cap 5'-terminal ao transcrito, através de uma ligação 5'-5'-trifosfato, adição de uma cauda poliadenosina a jusante do sinal AAUAAA, excisão dos dois intrões, e transporte do mRNA maduro para o citoplasma.

As diferenças nas eficiências traducionais dos mRNAs das α - e β -globinas parecem ser importantes no equilíbrio da síntese proteica. Em precursores eritróides normais, o mRNA da α -globina é duas a três vezes mais abundante

do que o mRNA da β -globina (Forget *et al.* 1975; Hunt *et al.* 1980); assim, a expressão equilibrada das proteínas α - e β -globinas é devida à alta eficiência traducional do mRNA da β -globina (Shakin e Liehaber, 1986).

Um determinante importante da expressão dos genes da globina é a grande estabilidade dos seus mRNAs. O tempo de semi-vida dos mRNAs não-globínicos, no tecido eritróide em diferenciação, é significativamente menor do que o do mRNA das globinas, para o qual têm sido descritos valores entre 16-60 horas (Valloch e Housman, 1981; Ross e Pizarro, 1983; Ross e Sullivan, 1985; Krowczynska *et al.* 1985). Esta relativa estabilidade permite que os mRNAs da globina se acumulem nos eritroblastos em fase terminal de diferenciação.

5. Determinantes do fenótipo talassémico

O fenótipo talassémico é consequência de um não-equilíbrio na síntese e/ou na estabilidade das α - e β -globinas (Weatherall *et al.* 1969). Na β -talassémia, as cadeias α -globina não tetramerizadas são tóxicas para o eritoblasto em desenvolvimento; na α -talassémia, as cadeias γ - e β -globina formam os homotetrâmeros γ_4 e β_4 não-funcionais (Hb Barts e Hb H, respectivamente), os quais começam a precipitar, diminuindo a sobrevivência do eritrócito (Fessas, 1963; Nathan e Gunn, 1966). O dano celular reflecte-se em anomalias morfológicas características, tais como eritrócitos pequenos e de forma irregular que, ocasionalmente, contêm precipitados intracelulares visíveis (Fessas, 1963). Muitos destes eritrócitos são rapidamente removidos da circulação periférica por macrófagos do fígado ou baço. Esta alta actividade do retículo endoplasmático das células do fígado e baço origina, em geral, hepato e esplenomegalia. Os eritroblastos gravemente afectados podem também ser destruídos na medula óssea antes da sua libertação, com consequente aumento compensatório das cavidades da medula, o que origina alterações esqueléticas significativas (Fessas, 1963; Nathan e Gunn, 1966; Slater *et al.* 1968). Assim, a hemólise, determinante do grau de gravidade da doença, está directamente relacionada com o grau de monómeros α - ou β -globina em excesso.

O grau de desequilíbrio na síntese das cadeias de globina depende do número, local e tipo dos defeitos moleculares nos genes da globina. Consequentemente, a gama complexa de génotipos talassémicos dá origem a um largo espectro de fenótipos talassémicos, que varia entre as formas clinicamente silenciosas e as letais.

5.1. α -Talassemia

Os indivíduos com α -talassemia são classificados em categorias clínicas que são, por ordem de gravidade crescente: portador silencioso, portador de α -talassemia, doença da hemoglobina H e *hidrops fetalis* (Weatherall, 1983; Bunn e Forget, 1986; Liebhaber, 1989; Schwartz e Benz, 1991). Estas categorias correspondem, em geral, à perda funcional de um, dois, três ou quatro genes α -globina, respectivamente. As variações fenotípicas reflectem o facto de a perda de um só gene α -globina poder resultar em diferentes graus de perda de capacidade de síntese da α -globina, dependendo de qual dos dois *loci* α -globina está afectado, ou se a perda é por deleção ou não-deleção e se a expressão génica está completa ou parcialmente comprometida (ver Tabela I).

A perda de um só gene α -globina não tem qualquer expressão clínica e é geralmente reconhecida em portadores obrigatórios apenas por estudos de família de *propositi* α -talassémicos. Por esta razão, um indivíduo com a perda de um só gene refere-se como portador silencioso. Embora estudos de grandes grupos destes indivíduos apresentem uma razão sintética $\alpha:\beta$ levemente reduzida (0.9) e um volume celular médio (MVC) abaixo do normal (75-85fl; Higgs *et al.* 1989), estas diferenças são demasiado pequenas para serem usadas como critério de diagnóstico. O diagnóstico definitivo de estado de portador silencioso, cuja importância se restringe ao aconselhamento genético, é geralmente baseado na demonstração da deleção de um só gene α -globina, a etiologia molecular mais frequentemente encontrada nos estudos de mapeamento por Southern blotting (Galanello *et al.* 1984; Romão *et al.* 1990).

Embora o estado de portador de α -talassemia reflita geralmente a perda de dois genes α -globina, este apresenta também uma evolução clínica muito benigna (Weatherall, 1983; Bunn e Forgett, 1986; Liebhaber, 1989; Schwartz e Benz, 1991). A grande maioria dos indivíduos deste grupo são assintomáticos, apresentando níveis normais de hemoglobina, MCV entre 65 e 70fl e uma razão sintética de globina $\alpha:\beta$ moderadamente reduzida (0.7; Schwartz *et al.* 1969; Higgs *et al.* 1989). Embora a Hb Barts (γ_4) possa estar presente em baixas concentrações ao nascimento (5-15%), a Hb H não se acumula a níveis mensuráveis em adultos. A deleção de dois genes α -globina é a base mais comum para o estado de portador de α -talassemia e está geralmente associada aos génotipos $--/\alpha\alpha$ ou $-\alpha/-\alpha$ (Liebhaber, 1989). As mutações não deleccionais podem também contribuir para esta situação, numa pequena fracção dos casos.

A única classe de α -talassemia clinicamente importante, porque compatível com a vida, é a doença de Hb H (Weatherall, 1983; Bunn e Forget, 1986; Schwartz e Benz, 1991). Este fenótipo reflecte geralmente a perda funcional de três dos quatro genes α -globina, com conseqüente decréscimo na razão sintética da globina ($\alpha:\beta=0.4$). Os indivíduos com doença de Hb H podem variar entre

assintomáticos e gravemente afectados dependentes de transfusão (Weatherall, 1983; Bunn e Forget, 1986; Schwartz e Benz, 1991). O aspecto típico é de anemia moderada (Hb de 8-10g/dl) com microcitose (MCV de 60-70fl) e marcadas anomalias morfológicas dos eritrócitos (Higgs *et al.* 1989). A Hb Barts está presente ao nascimento e os adultos podem apresentar níveis de Hb H na gama de 5-30%. Os tetrâmeros de Hb H solúveis têm elevada afinidade para o oxigénio, o que dificulta a libertação de O₂ sob condições fisiológicas; estes homotetrâmeros precipitam nos eritrócitos em circulação e podem ser visualizados como corpos de inclusão (Benesch *et al.* 1961; Fessas e Yataganas, 1968). O fenótipo de Hb H pode-se assemelhar a síndromas graves de β -talassémia.

O genótipo de doença da Hb H mais comum ($\alpha\alpha$) resulta geralmente num fenótipo relativamente suave. O genótipo menos comum ($\alpha\alpha^T$) é igualmente moderado, se o defeito não-deleccional ocorre no gene α_1 -globina (Moi *et al.* 1987). Ao contrário, os defeitos não-deleccionais no locus α_2 -globina ($\alpha\alpha^T$) podem dar origem a uma diminuição da produção de α -globina mais acentuada do que a perda deleccional do gene α_2 , pois não há qualquer aumento compensatório na expressão do gene α_1 -globina que permanece no cromossoma (Liebhaber *et al.* 1985; Moi *et al.* 1987; Liebhaber, 1989). A doença da Hb H pode também estar associada à perda não-deleccional dos dois genes α_2 -globina ($\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$; Paglietti *et al.* 1986), ou à perda de expressão dos dois genes α -globina presentes num cromossoma [$\alpha/(\alpha\alpha)^T$; Hatton *et al.* 1990; Wilkie *et al.* 1990; Liebhaber *et al.* 1990; Romão *et al.* 1991; Romão *et al.* 1992].

A completa ausência de produção de α -globina é incompatível com a vida extra-uterina (Weatherall, 1983; Bunn e Forget, 1986; Schwartz e Benz, 1991). A morte fetal ocorre geralmente no segundo trimestre de gestação; poucos fetos com *hidrops fetalis* sobrevivem até ao termo e os que conseguem sobreviver, morrem poucas horas após o nascimento.

6. Alterações moleculares que originam α -talassémia

6.1. Delecções

A perda de expressão dos genes α -globina reflecte frequentemente a deleccção de um segmento do agrupamento génico da α -globina. Muitas destas deleccções inactivam a expressão génica directamente pela remoção total ou parcial do(s) respectivo(s) gene(s). As deleccções deste tipo são uma causa comum de α -talassémia, onde um ou ambos os genes α -globina adjacentes podem ser afectados (Liebhaber, 1989). Tal como anteriormente referido, os genes α -globina podem também estar inactivos em *cis* por deleccções inteiramente externas a cada um dos agrupamentos que removam elementos regulatórios críticos; estas deleccções

podem inativar todos os genes do agrupamento gênico estruturalmente intacto (Hatton *et al.* 1990; Wilkie *et al.* 1990; Liebhaber *et al.* 1990; Romão *et al.* 1991); Romão *et al.* 1992). Assim, as deleções podem diminuir ou anular a expressão gênica por, pelo menos, dois mecanismos diferentes.

6.1.1. Deleções dos genes estruturais

As deleções de um só gene α -globina são a principal causa de α -talassémia em todo o mundo (Weatherall *et al.* 1986). Embora se tenha descrito mais de uma dúzia de deleções de um só gene α -globina, as deleções $-\alpha^{3.7}$ (Orkin *et al.* 1979) e $-\alpha^{4.2}$ (Embury *et al.* 1980) são as mais comuns. As frequências gênicas mais elevadas das mutações $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ encontram-se nas populações originárias de lugares onde o *P. falciparum* é ou foi, até há pouco tempo, endêmico. Tal como com a anemia das células falciformes, esta distribuição parece reflectir uma maior resistência dos heterozigotos à malária (Oppenheimer *et al.* 1984; Flint *et al.* 1986).

Os genes α_2 - e α_1 -globina contêm regiões de homologia que facilitam a recombinação homóloga, mas desigual, dos agrupamentos gênicos de modo a originar as deleções comuns de 3.7kb e 4.2kb. Estas grandes duplicações no agrupamento podem ser subdivididas em três sub-regiões de alta homologia de sequências: as caixas X, Y e Z (Lauer *et al.* 1980). As duas caixas Z (1741pb; 1708 bases idênticas) contêm os próprios genes α -globina, e vão desde 863 bases a 5' dos sítios cap até às 3' NTRs dos genes α -globina. As caixas Y (160pb) e as caixas X (1440pb; 1396 bases conservadas) estão localizadas a 5' de cada um dos genes α -globina. O entrecruzamento⁴ homólogo entre os dois cromossomas 16 que se alinham nas caixas X, Y ou Z resulta numa troca desigual de sequências. Por exemplo, a distância linear entre as duas caixas Z é de 3.7kb; o entrecruzamento entre os agrupamentos gênicos da α -globina que estão alinhados nesta região, resulta numa troca desigual de um segmento de 3.7kb e gera a deleção $-\alpha^{3.7}$ (Orkin *et al.* 1979). Os entrecruzamentos na caixa Z localizam-se num de três subsegmentos, resultando nas deleções $-\alpha^{3.7I}$, $-\alpha^{3.7II}$ e $-\alpha^{3.7III}$ (Michelson e Orkin, 1983). Em todos os casos, o único gene α -globina que permanece no cromossoma $-\alpha^{3.7}$ é estruturalmente idêntico ao gene α_1 -globina, pois o entrecruzamento ocorre a 5' da região onde os genes α_2 - e α_1 -globina divergem (intrão 2 e exão 3). A recombinação nas caixas X dos dois cromossomas resulta, de igual modo, na deleção de um segmento de 4.2kb

⁴ Tradução do termo inglês *crossingover*.

que contém o gene α_2 -globina (Embury *et al.* 1980). Em ambas as deleções, a remoção do *locus* α_2 -globina origina uma expressão do gene α_1 -globina que permanece nesse cromossoma, compensatoriamente mais elevada (Liebhaber *et al.* 1985).

Pensa-se que as deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ ocorrem por recombinação intercromossômica, pois rastreios de população na qual estas deleções são comuns revelam indivíduos que transportam os *loci* α -globina triplicados ($\alpha\alpha^{\text{anti}3.7}$ e $\alpha\alpha^{\text{anti}4.2}$), o que corresponde aos produtos recíprocos da recombinação intercromossômica (Higgs *et al.* 1980; Goossens *et al.* 1980; Galanello *et al.* 1983; Gu *et al.* 1987; Peres *et al.* 1993b). Também já se verificou que a frequência de recombinação entre os segmentos homólogos se correlaciona directamente com os seus comprimentos relativos: $-\alpha^{3.7I}$ (1436pb) > $-\alpha^{4.2}$ (1339pb) > $-\alpha^{3.7II}$ (171pb) > $-\alpha^{3.7III}$ (46pb). O entrecruzamento na região da caixa Y, por esta ser tão pequena, ainda não foi descrito.

Têm-se também identificado outras deleções de um ou ambos os genes α -globina. Estruturalmente, estas deleções são geralmente grandes (>20kb) e removem os dois genes α -globina, dando origem ao haplotipo (--). Entre as grandes deleções no agrupamento génico da α -globina, as mais comuns são as deleções $--^{SEA}$ (Winichagoon *et al.* 1984) e $--^{Med}$ (Sophocleous *et al.* 1981), as quais removem aproximadamente 20kb de DNA, incluindo os dois genes α -globina, deixando o gene ζ -globina intacto. As deleções mais extensas, de 30-80kb, podem incluir, além dos genes α -globina, também o gene ζ -globina. Estas deleções incluem as mutações $--^{Fil}$ (Fischel-Ghodsian *et al.* 1988), $--^{Thai}$ (Fischel-Ghodsian *et al.* 1988) e $--^{MC}$ (Higgs *et al.* 1989), que são observadas apenas em heterozigotos. Em contraste com as deleções $-\alpha^{3.7}$ e $\alpha^{4.2}$, as quais aparecem por um mecanismo de troca homóloga, todas as outras deleções são devidas a um mecanismo de recombinação ilegítima (não-homóloga). A ausência de cromossomas que contenham os produtos da troca recíproca análogos aos agrupamentos anti3.7 ou anti4.2 sugere que o acontecimento de recombinação que gera as deleções menos comuns do agrupamento da α -globina seja intracromossômico.

6.1.2. Deleções da região de controlo do agrupamento génico da α -globina

Os genes α_1 - e α_2 -globina podem ser funcionalmente inactivos por deleções em *cis*, fora do próprio agrupamento génico. Descreveram-se já cinco destas deleções que removem uma região localizada a aproximadamente 30-50kb a 5' do gene ζ -globina, contendo a LCR do agrupamento génico da α -globina (Hatton *et al.* 1990; Wilkie *et al.* 1990; Liebhaber *et al.* 1990; Romão

et al. 1991; Romão *et al.* 1992). Enquanto três destas deleções são muito grandes ($--^{\pi}$, $--^{MM}$ e $--^{IdF}$) e atingem, em dois dos casos ($--^{\pi}$, $--^{IdF}$), o telómero 16p, as outras duas são limitadas ($--^{RA}$, e $--^U$). Em pelo menos três destes casos ($--^U$, $--^{\pi}$ e $--^{IdF}$), demonstrou-se que os genes α -globina silenciosos estão estruturalmente intactos e são expressos a um nível normal quando transfectados em células de eritroleucemia de ratinho (MEL). Estes estudos dão ênfase ao facto de a perda de expressão destes genes resultar da deleção dos determinantes da LCR localizados a montante do agrupamento génico. Já que o estudo da interacção funcional entre o promotor do gene ζ -globina humana e o elemento HS-40 da α LCR permitiu demonstrar que este elemento funciona como um intensificador da actividade do promotor deste gene quando em cultura células eritróides embrionárias em fase transitória (Zhang *et al.* 1993), facilmente se assume que as deleções da α LCR *in vivo*, bloqueiam também a expressão do gene ζ -globina (ainda não foi directamente demonstrado), e que elas seriam letais quando em homozigotia.

6.2. Mutações não deleccionais

Ao contrário do que acontece com as talassémias deleccionais, as talassémias não-deleccionais são devidas a mutações de uma só base ou pequenas inserções ou deleções num só gene. Estas mutações podem afectar a actividade dos promotores dos genes, interferir com o processamento do pré-mRNA, com o transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma, desestabilizar o mRNA maduro, diminuir a sua eficiência de tradução, ou resultar na síntese de uma proteína instável ou não funcional. As mutações não deleccionais específicas para qualquer destes passos podem bloquear a expressão génica parcial ou totalmente, o que contrasta com a total perda de expressão que inevitavelmente resulta das mutações deleccionais. A gravidade clínica das talassémias não deleccionais está directamente relacionada com o número de genes mutados e o grau com que cada um contribui para a expressão génica normal.

A α -talassémia não deleccional foi descrita pela primeira vez em 1977 (Kan *et al.* 1977) e, desde então, os genes α -globina que contêm as diferentes mutações têm sido estudados em detalhe. Com a excepção de um determinante α -talassémico fenotipicamente suave, todas as mutações até agora descritas ocorrem no gene α_2 -globina. No entanto, o gene α_1 -globina que permanece estruturalmente intacto parece não sofrer qualquer alteração na sua expressão (Liebhaber *et al.* 1985). Assim, os determinantes α -talassémia não deleccionais originam uma redução na síntese proteica mais acentuada do que a dos cromossomas $-\alpha$.

6.2.1. Mutações no processamento do mRNA

As mutações não deleccionais que interferem com o normal processamento pós-transcricional dos transcritos primários do mRNA podem diminuir drasticamente a expressão do gene afectado. Muitas destas mutações afectam a precisão e/ou eficiência da excisão dos intrões, algumas resultando no processamento deficiente do *terminus* 3' do mRNA.

6.2.1.1. Mutações de excisão

A expressão normal dos genes da globina requer uma excisão precisa dos intrões do transcrito primário do DNA. A excisão normal depende da presença de sequências específicas nos sítios dador 5' e aceitador 3' do intrão (Shapiro e Senapathy, 1987). As sequências do sítio de excisão mais conservadas são os dinucleotídeos GT e AG, localizados nos *terminus* 5' e 3' do intrão e definem os sítios dador e aceitador, respectivamente. As bases nas vizinhanças destes dinucleotídeos, embora conservadas, não são invariáveis. Se a excisão normal é bloqueada, parcial ou completamente, os sítios de excisão alternativos, que estão normalmente silenciosos, podem ser activados. Estes sítios alternativos de excisão podem ser localizados no intrão ou exão e são frequentemente referidos como sítios críticos de excisão.

Das mutações α -talassémicas até agora descritas, uma consiste na deleção de cinco nucleotídeos no sítio dador do intrão 2 do gene α_2 -globina (GAG|GTGAGG→GAGG-----; Orkin *et al.* 1981; Felker *et al.* 1982). Esta mutação envolve a sequência GT invariável, eliminando a excisão do RNA a partir do sítio dador normal, e activa uma nova sequência dadora que se localiza dentro do exão 1.

6.2.1.2. Mutações na sequência AAUAAA

O hexanucleotídeo AAUAAA localiza-se na região 3' não traduzida da maioria dos mRNAs eucarióticos. Esta sequência específica, de modo ainda não conhecido, a clivagem do transcrito primário num único sítio, 10-30 bases a jusante deste determinante e a subsequente adição de um resíduo de 100-200 bases (cauda poli-A) ao *terminus* 3'. Quando mutados, estes sinais de poliadenilação, parecem diminuir a eficiência e precisão das reacções de processamento a 3'. A única mutação descrita deste tipo, é uma substituição AAUAAA→AAUAAG no gene α_2 -globina num indivíduo com α -talassémia (Higgs *et al.* 1983). Embora o processamento da extremidade 3' do mRNA da globina pareça requerer um sinal de poliadenilação AAUAAA intacto, mutações de um

só nucleotídeo neste hexanucleotídeo podem bloquear incompletamente o processamento normal, e permitir a expressão parcial do gene da globina afectado.

6.2.2. Mutações que interferem com a tradução

Os mRNAs maduros totalmente processados estão prontos para a tradução após serem transportados do núcleo para o citoplasma. A tradução do mRNA pode ser totalmente ou parcialmente inibida por uma variedade de mutações talassémicas. Estas mutações podem afectar a eficiência de tradução do mRNA da globina, por interferirem com o processo normal da iniciação, alongamento ou terminação da síntese dos peptídeos. Além destes efeitos directos na tradução, algumas destas mutações diminuem o nível do mRNA afectado.

6.2.2.1. Mutações no codão de iniciação AUG

A iniciação da tradução pode ser parcial ou completamente bloqueada por mutações no codão de iniciação ou em sequências imediatamente adjacentes (Pirastu *et al.* 1984; Morle *et al.* 1985; Olivieri *et al.* 1987; Moi *et al.* 1987). Quase todos os mRNAs eucarióticos começam a ser traduzidos no codão AUG. Foram já identificadas mutações do codão de iniciação AUG nos dois genes da α -globina em indivíduos com α -talassémia (α_2 : AUG \rightarrow ACG, Pirastu *et al.* 1984; α_1 AUG \rightarrow GUG, Moi *et al.* 1987).

A utilização eficiente do codão de iniciação AUG depende de uma sequência consensual favorável, geralmente uma purina (G ou A) a -3 e G a +4 (o A de AUG é definido como +1). As substituições de nucleotídeos em qualquer destas posições podem diminuir a utilização do sítio mutado para a iniciação da tradução, o que já foi observado *in vivo* num gene $-\alpha^{3.7}$ (CCACCAUGG \rightarrow CC--CAUGG; Morle *et al.* 1985).

6.2.2.2. Mutações sem sentido e por desfaseamento

A terminação prematura da tradução do mRNA pode ser o resultado de dois tipos de mutações não deleccionais: a substituição de nucleotídeos no mRNA da globina pode criar directamente um codão sem sentido; alternativamente, a deleção ou inserção de um ou dois nucleotídeos resulta num desfaseamento da leitura do mRNA, o que tornará, quase por certo, que o ribossoma encontre prematuramente um codão sem sentido. Os mRNAs com

qualquer destes tipos de mutação codificam globinas não funcionais que são truncadas na sua extremidade carboxilo e são rapidamente degradadas por enzimas proteolíticas celulares. Assim, a expressão de um gene afectado pode ser completamente inibida.

Foram descritos dois determinantes α -talassémia devidos à terminação prematura da tradução. Num dos casos, ocorreu uma mutação sem sentido no codão 116 do gene α_2 -globina (GAG→UAG; Liebhaber *et al.* 1987) e no outro caso ocorreu uma mutação por desfasamento devido à deleção de dois nucleotídeos envolvendo os codões 30 e 31 de um gene $-\alpha^{3.7}$ (GAGAGG→GAG-G; Safaya e Rieder, 1988).

6.2.2.3. Mutações anti-terminação

As mutações do codão de terminação do gene α_2 -globina são a principal causa de α -talassémia não-deleccional no Sudeste Asiático. Esta mutação anti-terminação (UAA→CAA) faz com que o ribossoma insira uma glutamina no codão 142 em vez de terminar a síntese do peptídeo (Clegg *et al.* 1971; Milner *et al.* 1971). O ribossoma continua a tradução por mais 30 codões na 3'NTR até encontrar o próximo codão de terminação em fase. A proteína mutante alongada, Hb Constant Spring (Hb CS), está presente em apenas 1-3% dos níveis normais de α -globina em heterozigotos (Clegg *et al.* 1971; Milner *et al.* 1971). Estes baixos níveis de proteína são explicados, em parte, pela instabilidade da Hb CS. No entanto, a expressão génica é principalmente limitada pela marcada instabilidade do mRNA α^{CS} (Liebhaber e Kan, 1981; Hunt *et al.* 1982). Em indivíduos afectados, o nível relativo de mRNA da α^{CS} -globina na medula óssea é apenas levemente diminuído, enquanto nos reticulócitos de sangue periférico, este mRNA está totalmente ausente (Liebhaber e Kan, 1981). Estas observações sugerem que o mRNA da α^{CS} -globina seja instável *in vivo*, quando comparado com o mRNA normal da α_2 -globina, uma vez que as células precursoras dos reticulócitos se diferenciam durante 2 a 3 dias após a transcrição ter ocorrido. A instabilidade do mRNA de α^{CS} não parece relacionar-se com a alteração da sequência primária *per se*, pois diversos genes α -globina com outras mutações anti-terminação [Hb Icaria (UAA→AAA; Clegg *et al.* 1974); Hb Koya Dora (UAA→UCA; Dejong *et al.* 1975); Hb Seal Rock (UAA→GAA; Bradley *et al.* 1975)] expressam o mRNA mutante e proteína a níveis semelhantes ao gene α^{CS} . O mecanismo que medeia a instabilidade dos mRNAs anti-terminação é possivelmente o que opera na destabilização de outros mRNAs mutantes não relacionados. Uma mutação por desfasamento UCC→UC- no codão 138 do gene α_2 -globina (Hb Wayne; Hanash *et al.* 1977)

também permite ao ribossoma a tradução para além do codão de terminação normal na região 3' transcrita mas não traduzida. Isto sugere que a entrada dos ribossomas na 3' NTR pode desestabilizar directamente o mRNA, possivelmente pela interrupção da ligação de um elemento de estabilização (Liebhaber, 1992; comunicação pessoal).

6.3. Globinas mutantes instáveis

A talassémia também pode resultar da expressão de variantes estruturais específicas das α - e β -globinas. Mutações por desfasamento ou de sentido alterado, nos genes que codificam estas globinas, geralmente alteram o tamanho, carga ou hidrofobicidade dos resíduos cruciais para que o monómero da globina dimerize e se forme uma hemoglobina estável. Estes monómeros de globina anormais são extremamente instáveis. Por exemplo, a variante da α_2 -globina $\alpha^{\text{Quong Sze}}$ contém no codão 125 a mutação Leu \rightarrow Pro (CTG \rightarrow CCG), a qual altera uma hélice da α -globina que é crucial para uma apropriada interacção α - β (Kan *et al.* 1977; Goossens *et al.* 1982). Deste modo, as cadeias β -globina, em excesso, associam-se como tetrâmeros β_4 (Hb H) originando um fenótipo de α -talassémia.

A gravidade do síndrome clínico associado às globinas hiperinstáveis distingue-as dos tipos mais comuns de talassémia. Muitas destas globinas hiperinstáveis resultam numa talassémia clinicamente significativa, mesmo em heterozigotos (chamada «talassémia dominante»). Pensa-se que a rápida degradação destas globinas satura a capacidade proteolítica do eritroblasto em maturação (Adams *et al.* 1990). Assim, no caso de variantes β -globina hiperinstáveis, o excesso de cadeias α -globina tóxicas precipita e acumula-se nos eritroblastos da medula, resultando em elevados níveis de eritropoiese ineficiente. Esta hipótese tem sido consubstanciada pela existência de cadeias α -globina em corpos de inclusão de eritroblastos em indivíduos com variantes hiperinstáveis da cadeia β (Fei *et al.* 1989). Deste modo, as consequências usuais do desequilíbrio das cadeias α - e β -globina são mais fortes em indivíduos com variantes da globina hiperinstáveis, devido à capacidade reduzida do eritroblasto na degradação do excesso de monómeros de globina tóxicos. Exemplos de variantes α -globina altamente instáveis são a Quong Sze ($\alpha_2^{125\text{Leu}\rightarrow\text{Pro}}$; Goossens *et al.* 1982; Liebhaber e Kan, 1983), a Suan Dok ($\alpha_2^{109\text{Leu}\rightarrow\text{Arg}}$; Sanguanserm Sri *et al.* 1979; Steinberg *et al.* 1987), a Petah Tikvah ($\alpha_2^{110\text{Ala}\rightarrow\text{Asp}}$; Honing *et al.* 1981) e a Evanston ($-\alpha^{14\text{Trp}\rightarrow\text{Arg}}$; Honing *et al.* 1984).

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. G.; STEINBERG, M. H.; KAZAZIAN, H. H. — Isolation and characterization of the translation product of a β -globin gene nonsense mutation ($\beta^{121GAA \rightarrow TAA}$). *Brit J. Haematol*, 75: 561. 1990.
- ALBITAR, M.; PESCHLE, C.; LIEBHABER S. A. — Theta, zeta, and epsilon globin messenger RNAs are expressed in adults. *Blood*, 74: 629. 1989.
- ALBITAR, M.; KATSUMATA M.; LIEBHABER, S. A. — Human α -globin genes demonstrate autonomous developmental regulation in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.*, 11: 3786. 1991.
- ALBITAR, M.; CARE, A.; PESCHLE, C.; LIEBHABER, S. A. — Developmental switching of mRNA expression from the human α -globin cluster: fetal/adult pattern of θ -globin gene expression. *Blood*, 80: 1586. 1992a.
- ALBITAR, M.; CASH, F. E.; LIEBHABER S. A. — Developmental switch in the relative expression of the α_1 - and α_2 -globin genes in humans and in transgenic mice. *Blood*, 79: 2471. 1992b.
- BARALLE, F. E.; SHOULDERS, C. C.; PROUDFOOT N. J. — The primary Baysal E. The β - and δ -thalassemia repository. *Hemoglobin*, 16: 237. 1992.
- BEHRINGER, R. R.; HAMMER R. E.; BRINSTER, R. L.; TOWNES, T. M. — Two 3' sequences direct adult erythroid-specific expression of the human β -globin genes in transgenic mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 84: 7056. 1987.
- BEHRINGER, R. R.; RYAN, T. M.; BRINSTER, R. L.; TOWNES, T. M. — Human γ - to β -globin gene switching in transgenic mice. *Genes Develop*, 4: 380. 1990.
- BENESCH, R. E.; RANNEY, H. M.; BENESCH, R.; SMITH, G. M. — The chemistry of the Bohr effect. *J. Biol. Chem.*, 236: 2926. 1961.
- BERRY, M.; DILLON, N.; GROSVELD, F. — A single point mutation is the cause of the Greek form of hereditary persistence of foetal haemoglobin. *Nature*, 358: 499. 1992.
- BLOM VAN ASSENDEL, G.; HANSCOMBE, O.; GROSVELD, F.; GREAVES D. R. — The β -globin dominant control region activates homologous and heterologous promoters in a tissuespecific manner. *Cell*, 56: 969. 1989.
- BODINE, D. M.; LEY, T. J. — An enhancer element lies 3' to the Agamma globin gene. *EMBO J.*, 6: 2997. 1987.
- BOHMANN, D.; BOS, T. J.; ADMON, A.; NISHIMURA, T.; VOGT, P. K; TJIAN, R. — Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science*, 238: 1386. 1987.
- BRADLEY, T. B.; WHOL, R. C.; SMITH, G. J. — Elongation of the α -globin chain in a Black family: interaction with Hb GPhiladelphia. *Clin. Res.*, 23: 131A. 1975.
- BRADY, H. J. M.; SOWDEN, J. C.; EDWARDS, M.; LOWE, N.; BUTTERWORTH, P. H. W. — Multiple GF-1 binding sites flank the erythroid-specific transcription unit of the human carbonic anhydrase I gene. *FEBS Lett*, 257: 451. 1989.
- BREATHNACH, R.; CHAMBON, P. — Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Ann. Rev. Bioch*, 50: 349. 1981.
- BUCKLE, V. J.; HIGGS, D. R.; WILKIE, A. O. M.; SUPER, M.; WEATHERALL, D. J. — Localisation of human α -globin to 16p13.3-pter. *J. Med. Genet*, 25: 847. 1988.
- BUNN, H. F.; FORGET, B. G. — Human hemoglobins. W. B. Saunders, Philadelphia. 1977.
- BUNN, H. F.; MCDONALD, M. J. — Electrostatic interactions in the assembly of human hemoglobin. *Nature*, 306: 498. 1983.
- BUNN, H. F.; FORGET, B. G. — The thalassemias — clinical manifestations. W. B. Saunders, Philadelphia. 1986.

- CAPPELLINI, M. D.; FIORELLI, G.; BERNINI, L. F. — Interaction between homozygous β^0 -thalassemia and the Swiss type of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Brit. J. Haematol*, 48: 561. 1981.
- CAO, S. X.; GUTMAN, P. D.; DAVE, H. P. G.; SCHECHTER, A. N. — Identification of a transcriptional silencer in the 5' flanking region of the human ϵ -globin gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86: 5306. 1989.
- CHADA, K.; MAGRAM, J.; CONSTANTINI, F. — An embryonic pattern of expression of a human fetal globin gene in transgenic mice. *Nature*, 319: 685. 1986.
- CHANG, J. C.; KAN, Y. W. — β^0 -thalassemia, a nonsense mutation in man. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76: 2886. 1979.
- CHANG, L-YE; SLINGHTOM, J. L. — Isolation and nucleotide sequence analysis of the β -type globin pseudogene from human, gorilla, and chimpanzee. *J. Mol. Biol.*, 180: 767. 1984.
- CHODOSH, L. A.; BALDWIN, A. S.; CARTHEW, R. W.; SHARP, P. A. — Human CCAAT-binding proteins have heterologous sub-units. *Cell*, 55: 11. 1988.
- CHOI, O. R.; ENGEL, J. D. — Developmental regulation of β -globin gene switching. *Cell*, 55: 17. 1988.
- CHUI, D. H. K.; MENTZER, W. C.; PATTERSON, M.; IAROCCI, T. A.; EMBURY, S. H.; PERRINE, S. P.; MIBASHAN, R. S. HIGGS, D. R. — Human embryonic ζ -globin chains in fetal and newborn blood, 74: 1409. 1989.
- CLEGG, J. B.; WEATHERALL, D. J.; MILNER, P. F. — Hemoglobin Constant Spring: a chain termination mutant? *Nature*, 234: 337. 1971.
- CLEGG, J. B.; WEATHERALL, D. J.; CONTOPOLOU-GRIVA, I.; CAROUTSOS, K.; POUNGOUROAS, P. TSEVRENIS, H. — Haemoglobin Icaria, a new chain termination mutant which causes α -thalassemia. *Nature*, 251: 245. 1974.
- COGINS, L. W.; LANYON, W. G.; SLATER, A. A.; GRINDLAY, G. J.; PAUL, J. — Characterization of Alu family repetitive sequences which flank human β -type globin genes. *Bioschi Rep.*, 1: 309. 1981.
- COLLIS, P.; ANTONIOU, M.; GROSVELD, F. — Definition of the minimal requirements within the human β -globin gene and the dominant control region for high level expression. *EMBO J.*, 9: 233. 1990.
- CURTIN, P.; PIRASTU, M.; KAN, Y. W.; GOBERT-JONES, J. A.; STEPHENS, A. D.; LEHMANN, H. — A distant gene deletion affects β -globin gene function in an atypical $\gamma\delta$ -thalassemia. *J. Clin Invest*, 76: 1554. 1985.
- DEBOER, E.; ANTONIOU, M.; MIGNOTTE, V.; WALL, L.; GROSVELD, F. — The human β -globin promoter; nuclear protein factors and erythroid specific induction of transcription. *EMBO J.*, 7: 4203. 1988.
- DEISSEROTH, A.; NEINHUIS, A.; TURNER, P.; VELEZ, R.; ANDERSON, W. F.; RUDDLE, F.; LAWRENCE, J.; CREAGON, R.; KUCHERLAPATI, R. — Localization of the human α -globin structural gene to chromosome 16 in somatic cell hybrids by molecular hybridization assay. *Cell*, 12: 205. 1977.
- DEISSEROTH, A.; NEINHUIS, A.; LAWRENCE, J.; GILES, R.; TURNER, P.; RUDDLE, F. H. — Chromosomal localization of human β -globin gene on human chromosome 11 in somatic cell hybrids. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75: 1456. 1978.
- DEJONG, W. W.; KHAN, P.; BERNINI, L. F. — Hemoglobin Koya Dora: high frequency of a chain termination mutant. *Am. J. Hum. Gen.*, 27: 81. 1975.
- DICKERSON, R. E.; GEIS, I. — Hemoglobin: Structure, function, evolution, and pathology. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, California. 1983.
- DIERKS, P.; VAN OUYEN, A.; COCHRAN, M. D.; DOKRIN, C.; REISER, J.; WEISSMAN, C. — Three regions upstream from the cap site are required for efficient and accurate transcription of the rabbit β -globin gene in mouse 3T6 cells. *Cell*, 32: 695. 1983.

- DILLON, N.; GROSVELD, F. — Human globin genes silenced independently of other genes in the β -globin locus. *Nature*, 350: 252. 1991.
- DONAVAN-PELUSO, M.; ACUTO, S.; O'NEILL, D.; HORN, A.; MAGGIO, D.; BANK, A. — The β -globin 3' enhancer element confers regulated expression on the human γ -globin gene in the human embryonic-fetal erythroleukemia cell line K562. *Blood*, 77: 855. 1991.
- DRISCOLL M. C.; DOBKIN, C. S.; ALTER, B. P. — $\gamma\delta\beta$ -thalassemia due to a *de novo* mutation deleting the 5' β -globin gene activation-region hypersensitive sites. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86: 7470. 1989.
- ELION, J.; BERG, P. E.; LAPOUMÉROULIE, C.; TRABUCHET, G.; MITTELMAN, M.; KRISHNAMOORTHY, R.; SCHECHTER, A. N.; LABIE, D. — DNA sequence variation in a negative control region 5' to the β -globin gene correlates with the phenotypic expression of the bs mutation. *Blood*, 79: 787. 1992.
- EMBURY S. H.; LEBO, R. V.; DOZY, A. M.; KAN, Y. W. — Organization of the α -globin genes in the Chinese α -thalassemia syndromes. *J. Clin. Invest.*, 63: 1307. 1979.
- EMBURY, S. H.; MILLER, J. A.; DOZY, A. M.; KAN Y. W.; CHAN, V.; TODD, D. — Two different molecular organizations account for the single α -globin gene of the α -thalassemia-2 genotype. *J. Clin. Invest.*, 66: 1319. 1980.
- ENVER, T.; RAICH, N.; EBENS, A. J.; PAPAYANNOULU, Y.; CONSTANTINI, F.; STAMATOYANNOPOULOS, G. — Developmental regulation of human fetal-to-adult globin gene switching in transgenic mice. *Nature*, 344: 309. 1990.
- EPNER, E.; FORRESTER, W. C.; DRISCOLL, M. C.; ENVER, T.; BRICE, M.; PAPAYANNOPOULOU, T.; GROUDINE, M. — A deletion of the human β -globin locus activation region (LAR) causes a major alteration in chromatin structure and replication across the entire β -globin locus (abstract). Seventh Conference on Hemoglobin Switching, Arlie House, Arlie, VA, 1990.
- EVANS, T.; REITMAN, M.; FELSENFELD, D. — An erythroid-specific DNA-binding factor common to all chicken globin genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85: 5976. 1988.
- EVANS, T.; FELSENFELD, G. — The erythrocyte specific transcription factor Eryf1: a new finger protein. *Cell*, 58: 877. 1989.
- EVANS, T.; FELSENFELD, G.; REITMAN, M. — Control of globin gene transcription. *Ann. Rev. Cell. Biol.*, 6: 95. 1990.
- FEI, Y. J.; FUJITA, S.; HUISMAN, T. H. J. — Two different theta (θ) globin gene deletions observed among black newborn babies. *Brit J. Haematol*, 68: 249. 1988.
- FEI, Y. J.; STOMING, T. A.; KUTLAR, A.; HUISMAN, T. H. J.; STAMATOYANNOPOULOS, G. — One form of inclusion-body β -thalassemia is due to a GAA \rightarrow TAA mutation at codon 121 of the β -chain. *Blood*, 73: 1075. 1989.
- FELBER, B. K.; ORKIN, S. H.; HAMER, D. H. — Abnormal RNA splicing causes on form of α -thalassemia. *Cell*, 29: 895. 1982.
- FESSAS, P. — Inclusions of hemoglobin in erythroblasts and erythrocytes of thalassemia. *Blood*, 21: 21. 1963.
- FESSAS, P.; YATAGANAS, X. — Intraerythroblastic instability of hemoglobin β_4 (Hb H). *Blood*, 31: 323. 1968.
- FISCHEL-GHODSIAN, N.; NICHOLS, R. D.; HIGGS, D. R. — Long range genome structure around the human alpha-globin complex analyzed by PFGE. *Nucl. Acids. Res.*, 15: 6197. 1987a.
- FISCHEL-GHODSIAN, N.; HIGGS, D. R.; BEYER, E. C. — Function of a new globin gene. *Nature*, 392: 397. 1987b.
- FISCHEL-GHODSIAN, N.; NICHOLLS, R. D.; HIGGS, D. R. — Unusual features of CpG-rich (HTF) islands in the human α -globin complex: association within the 3' portion of the ζ -gene. *Nucl Acids Res*, 15: 9215. 1987c.

- FISCHEL-GHODSIAN, N.; VICKERS, M. A.; SEIP M.; WINICHAGOON, P.; HIGGS, D. R. — Characterization of two deletions that remove the entire human ζ - α -globin gene complex (—^{Thai} and —^{Fil}). *Brit J. Haematol*, 70: 233. 1988.
- FLINT, J.; HILL, A. V. S.; BOWDEN, D. K.; OPPENHEIMER, S. J.; SILL, P. R.; SERJEANTSON, S. W.; BANA-KOIRI, J.; BHATIA, K.; ALPERS, M. P.; BOYCE, A. J.; WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. — High frequencies of alphas-thalassemia are the result of natural selection by malaria. *Nature*, 321: 44. 1986.
- FORGET, B. G.; HOUSMAN, D.; BENZ, E. J.; MCCAFFREY, R. P. — Synthesis of DNA complementary to separated human alpha and beta globin messenger mRNAs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72: 984. 1975.
- FORRESTER, W. C.; THOMPSON, C.; ELDER, J. T.; GROUDINE, M. — A developmentally stable chromatin structure in the human β -globin gene cluster. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83: 1359. 1986.
- FORRESTER, W. C.; NOVAK, U.; GELINAS, R.; GROUDINE, M. — Molecular analysis of the human β -globin locus activation region. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86: 5439. 1989.
- FORRESTER, W. C.; EPNER, E.; DRISCOLL, M. C.; ENVER, T.; BRICE, M.; PAPAYANNOPOULOU, T.; GROUDINE, M. — A deletion of the human β -globin locus activation region causes a major alteration in chromatin structure and replication across the entire β -globin locus. *Genes Develop*, 4: 1637. 1990.
- FOX, G. M.; HESS, J. F.; SHEN, C-K J.; SCHMID, C. W. — Alu family members in the human α -like globin gene cluster. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 47: 1131. 1983.
- FRASER, P.; HURST, J.; COLLINS, P.; GROSVELD, F. — DNase I hypersensitive sites 1, 2, and 3 of the human β -globin dominant control region direct position-independent expression. *Nucl Acids Res*, 18: 3503. 1990.
- FRASER, P.; PRUZINA, S.; ANTONIOU, M.; GROSVELD, F. — Each hypersensitive site of the human β -globin locus control region confers a different developmental pattern of expression on the globin genes. *Genes Develop*, 7: 106. 1993.
- FRICTSCH, E. F.; LAWN, R. M.; MANIARIS, T. — Molecular cloning and characterization of the human β -like globin gene cluster. *Cell*, 19: 959. 1980.
- GALE, R. E.; CLEGG, J. B.; HUEHNS, E. R. — Human embryonic hemoglobins Gower-1 and gower-2. *Nature*, 280: 162. 1979.
- GALANELLO, R.; RUGGERI, R.; PAGLIETTI, E.; ADDIS, M.; MELIS, M. A.; CAO, A. — A family with segregating triplicated α -globin loci and β -thalassemia. *Blood*, 62: 1035. 1983.
- GALANELLO, R.; MACCIONI, L.; RUGGERI, R.; PERSEU, L.; CAO, A. — α -Thalassemia in sardinian newborns. *Brit. J. Haematol*, 58: 361. 1984.
- GATALA, f.; DEBOER, E.; HABETS, G.; GROSVELD, F. — Nuclear protein factors and erythroid transcription of the human γ -globin gene. *Nucl. Acids. Res.*, 17: 3811. 1989.
- GOODMAN, M. — Decoding the pattern off protein evolution. *Prog. Biophys Mol. Biol.*, 37: 105. 1981.
- GOODMAN, M.; WEISS, M. L.; CZELUSNIAK, J. — Molecular evolution above the species level: branching pattern, rates, and mechanisms. *Systematic Zoology*, 31: 376. 1982.
- GOODBOURN, SEY; CLEGG, J. B.; WEATHERALL, D. J. — Molecular basis of length polymorphism in the human α -globin gene cluster. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 80: 5022. 1983.
- GOOSSENS, M.; DOZY, A. M.; EMBURY, S. H. ZACHARIADES, Z.; HADJIMINAS, M. G.; STAMOTOYANNOPOULOS, G.; KAN, Y. W. — Triplicated α -globin loci in humans. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 77: 518. 1980.
- GOOSSENS, M.; LEE, K. Y.; LIEBHABER, S. A.; KAN, Y. W. — Globin structural mutant $\alpha^{125Leu \rightarrow Pro}$ is a novel cause of α -thalassemia. *Nature*, 296: 864. 1982.
- GROSVELD, F.; VAN ASSENDELFF, G. B.; GREAVES, D. R.; KOLIAS, G. — Position-

- independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell*, 51: 975. 1987.
- GROUDINE, M.; KOHWI-SHIGEMATSU, T.; GELINAS, R.; STAMATOYANNOPOULOS, G.; PAPAYANNOPOULOU, T. — Human fetal to adult hemoglobin switching: changes in chromatin structure of the β -globin gene locus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 80: 7551. 1983.
- GU Y.C.; LANDMAN, H.; HUISMAN, T. H. J. — Two different quadruplicated alpha-globin gene arrangement. *Brit J. Haematol*, 66: 245. 1987.
- GAMUCIO, D. L.; ROOD, K. L.; GRAY, T. A.; RIORDAN, M. F.; SARTOR, C. I.; COLLINS, F. S. — Nuclear proteins that bind the human γ globin gene promoter: alterations in binding produced by point mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 5310. 1988.
- HANASH, S. M.; WINTER, W. P.; RUCKNAGEL, D. L. — Synthesis of hemoglobin WAYne in erythroid cells. *Nature*, 269: 717. 1977.
- HANNON, R.; EVANS, T.; FELSENFELD, G.; GOULD, H. — Structure and promoter activity of the gene for the erythroid transcription factor GATA-1. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 88: 3004. 1991.
- HANSCOMBE, O.; WHYATT, D.; FRASER, P.; YANNOUTSOS, N.; GREAVES, D.; DILLON, N.; GROSVELD, F. — Importance of globin gene order for correct development expression. *Genes Develop*, 5: 1387. 1991.
- HATTON, C. S. R.; WILKIE, A. O. M.; DRYSDALE, H. C.; WOOD, W. G.; VICKERS, M. A.; SHARP, J.; AYYUB, H.; PRETORIUS, I. M. BUCKLE, B. J.; HIGGS, D. R. — Alpha-thalassemia caused by a large (62kb) deletion upstream of the human alpha globin gene cluster. *Blood*, 76: 221. 1990.
- HECHT, F.; MOTULSKY, A. G.; LEMIRE, R. J.; SHEPARD, T. E. — Predominance of hemoglobin Gower-1 in early human embryonic development. *Science*, 152: 91. 1966.
- HIGGS, D. R.; OLD, J. M.; PRESSLEY, L.; CLEGG, J. B.; WEATHERALL, D. J. — A novel α -globin gene arrangement in man. *Nature*, 284: 632. 1980.
- HIGGS, D. R.; GOODBOURN, S. E. Y.; LAMB, J.; CEGG, J. B.; WEATHERALL, D. J.; PROUDFOOT, N. J.: α -thalassemia caused by a polyadenylation signal mutation. *Nature*, 306: 398. 1983.
- HIGGS, D. R.; HILL, A. V. S.; BOWDEN, D. K.; WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. — Independent recombination events between the duplicated human α -globin genes; implications for their concerted evolution. *Nucl. Acids. Res.*, 12: 6965. 1984.
- HIGGS, D. R.; WAINSCOAT, J. S.; FLINT, J.; HILL, A. V. S.; THEIN, S. L.; NICHOLS, R. D.; TEAL, H.; AYYUB, H.; PETO, T. E. A.; FALUSI, A. G.; JARMAN, A. P., CLEHH, J. B.; WEATHERALL, D. J. — Analysis of the human α -globin gene cluster reveals a highly informative genetic locus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83: 5165. 1986.
- HIGGS, D. R.; VICKERS, M. A.; WILKIE, A. O. M.; PRETORIUS I-M; JARMAN, A. P.; WEATHERALL, D. J. — A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. *Blood*, 73: 1081. 1989.
- HIGGS, D. R.; WOOD, W. G.; JARMAN, A. P.; SHARPE, J.; LIDA, J.; PRETORIUS, I-M; AYYUB, H. — A major positive regulatory region located far upstream of the human alpha-globin gene locus. *Genes Develop*, 4: 1588. 1990a.
- HIGGS, D. R.; WOOD, W. G.; JARMAN, A. P.; VICKERS, M. A.; WILKIE, A. O. M.; LAMB, J.; VYAS, P.; BENNETT, J. P. — The alpha-thalassemias. *Ann NY Acad. Sci.*, 612: 15. 1990b.
- HONING, G. R.; SHAMSUDDIN, M.; ZAIZOV, R.; STEIBHERZ, M. SOLAR, I.; KIRSCHMAN, C. — Hemoglobin Petah Tikvah (α 110 Ala \rightarrow Asp): A new unstable variant with α -thalassemia-like expression. *Blood*, 57: 705. 1981.

- HONING, G. R.; SHAMSUDDIN, M.; VIDA, L. N.; MOMPOINT, M.; VALCOURT, E.; BOWIE, I. J.; JONES, E. C.; POWERS, P. A.; SPRITZ, R. A.; GUIB, M.; EMBURY, S. H.; CONBOY, J.; KAN, Y. W.; MENTZER, W. C.; WEIL, S. C.; HIRATA, R. K.; WALCOCH, J.; O'RIORDAN, J. F.; GOLDSTICK, T. K. — Hemoglobin Evanston ($\alpha 14$ Trp \rightarrow Arg): An unstable α -chain variant expressed as α -thalassemia. *J. Clin. Invest.*, 73: 1740. 1984.
- HUEHNS, E. R.; DANCE, N. BEAVEN, G. H.; HECHT, F.; MOTULSKY, A. G. — Human embryonic hemoglobins. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 29: 327. 1964.
- HUEHNS, E. R.; BEAVEN, G. H. — Developmental changes in human hemoglobins. *Clin. Dev. Med.*, 37: 175. 1971.
- HUNT, D. M.; HIGGS, D. R.; OLD, J. M.; CLEGG, F. B.; WEATHERALL, D. J.; MARSH, G. W. — Determination of α -thalassemia phenotypes by messenger RNA analysis. *Brit J. Haematol*, 45: 53. 1980.
- HUNT, D. M.; HIGGS, D. R.; OLD, J. M.; CLEGG, F. B.; WEATHERALL, D. J. — Hemoglobin Constant Spring has an unstable α -chain messenger RNA. *Brit J. Haematol*, 51: 405. 1982.
- IKUTA, T.; KAN, Y. W. — In vivo protein-DNA interactions at the β -globin gene locus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 88: 10188. 1991.
- JARMAN, A. P.; NICHOLS, R. D.; WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B.; HIGGS, D. R. — Molecular characterization of a hypervariable region downstream of the human α -globin gene cluster. *EMBO J.*, 5: 1857. 1986.
- JARMAN, A. P.; HIGGS, D. R. — A new hypervariable marker for the human α -globin gene cluster. *Am. J. Hum. Genet.*, 43: 249.
- JARMAN, A. P.; WOOD, W. G.; SHARPE, J. A.; GOURDON, G.; AYYUB, H.; HIGGS, D. R. — Characterization of the major regulatory element upstream of the human α -globin gene cluster. *Mol. Cell. Biol.*, 11: 4679. 1991.
- JONXIS, J. H. P.; HUISMAN, T. H. J. — Abnormal hemoglobins. 2nd edn, Blackwell Scientific, Oxford. 1968.
- KAN, Y. W.; DOZY, A. M.; TRECARTIN, M. S.; TODD, D. — Identification of a nondeletion defect in α -thalassemia. *N. England J. Med.*, 297: 1081. 1977.
- KAZAZIAN, H. H.; WOODHEAD, A. P. — Hemoglobin synthesis in the developing fetus. *N. England J. Med.*, 289: 58. 1973.
- KAZAZIAN, H. H. — The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Heme*, 27: 209. 1990.
- KOLLIAS, G.; WRIGHTON, N.; HURTS, J.; GROSVELD, F. — Regulated expression of human α , β - and hybrid $\gamma\beta$ -globin genes in transgenic mice: manipulation of the developmental expression patterns. *Cell*, 46: 89. 1986.
- KOLIAS, G.; HURST, J.; DE BOER, E.; GROSVELD, F. — The β -globin gene contains a downstream developmental specific enhancer. *Nucl Acids Res*, 15: 5739. 1987.
- KROWCZYNSKA, A.; YENOFISKY, R.; BRWERMANN, G. — Regulation of messenger RNA stability in mouse erythroleukemia cells. *J. Mol. Biol.*, 181: 231. 1985.
- KULOZIK, A. E.; BAIL, S.; BELLAN-KOCH, A.; BARTRAM, C. R.; KOHNE, E.; KLEIHAUER, E. — The proximal element of the β -globin locus control region is not functionally required in vivo. *J. Clin. Invest*, 87: 2142. 1991.
- KUNKEL, H. G.; CEPPELLINI, R.; MULLER-EBERHARD, U.; WOLF, J. — Observations on the minor basic hemoglobin components in the blood of normal individuals and patients with thalassemia. *J. Clin Invest*, 36: 1615. 1957.
- LAFLAMME, S.; ACUTO, S.; MARKOWITZ, D.; VICK, L.; LANDSCHULTZ, W.; BANK, A. — Expression of chimeric human β - and δ -globin genes during erythroid differentiation. *J. Biol. Chem.*, 262: 4819. 1987.

- LAMB, J.; HARRIS, P. C.; WILKIE, A. O. M.; WOOD, W. G.; DAUWERSE, J. G.; HIGGS, D. R. — De novo truncation of chromosome 16p and healing with (TTAGGG)_n in the α -thalassemia/mental retardation syndrome (ATR-16). *Am. J. Hum. Genet.*, 52: 668. 1993.
- LAUER, J.; SHEN, CK-K J.; MANIATIS, T. — The chromosomal arrangement of human α -like globin genes: sequence homology and α -globin gene deletions. *Cell*, 20: 119. 1980.
- LAWN, R. M.; EFSTRATIADIS, A.; O'CONNELL, C.; MANIATIS, T. — The nucleotide sequence of the human β -globin gene. *Cell*, 21: 647. 1980.
- LEBO, R. V.; CARRANO, A. V.; BURKHART-SCHULTZ, K.; DOZY, A. M.; YU, L-C.; KAN, Y. W. — Assignment of human β -, γ -, and δ -globin genes to the short arm of chromosome 11 by chromosome sorting and DNA restriction enzyme analysis. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 76: 5804. 1979.
- LEUNG, S.; PROUDFOOT, N. J.; WHITELAW, E. — The gene for theta globin is transcribed in human fetal erythroid tissues. *Nature*, 329: 551. 1987.
- LEUNG, S.; WHITELAW, E.; PROUDFOOT, N. J. — Transcriptional and translational analysis of the human theta globin gene. *Nucl Acids Res.*, 17: 8283. 1989.
- LI, R.; KNIGHT, J. D.; JACKSON, S. P.; TJIAN, R.; BOTCHAN, M. R. — Direct interaction between Sp1 and the BPV enhancer E2 protein mediates synergistic activation of transcription. *Cell* 65: 493. 1991.
- LIEBHABER, S. A.; GOOSSENS, M.; KAN, Y. W. — Cloning and complete nucleotide sequence of human 5' α -globin gene. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 77: 7054. 1980.
- LIEBHABER, S. A.; GOOSSENS, M.; KAN, Y. W. — Homology and concerted evolution at the α_1 - and α_2 -gene loci of human α -globin. *Nature*, 290: 26. 1981.
- LIEBHABER, S. A.; KAN, Y. W. — Differentiation of the mRNA transcripts originating from the α_1 - and α_2 -globin loci in normals and α -thalassemics. *J. Clin Invest.*, 68: 439. 1981.
- LIEBHABER, S. A.; KAN, Y. W. — α -Thalassemia caused by an unstable α -globin mutant. *J. Clin Invest.*, 71: 461. 1983.
- LIEBHABER, S. A.; CASH, F. E.; MAIN, D. M. — Compensatory increase in α_1 -globin gene expression in individuals heterozygous for the α -thalassemia-2 deletion. *J. Clin Invest.*, 76: 1057. 1985.
- LIEBHABER, S. A.; CASH, F. E.; BALLAS, S. K. — Human α -globin gene expression: the dominant role of the α_2 -locus in mRNA and protein synthesis. *J. Biol. Chem.*, 261: 15327. 1986.
- LIEBHABER, S. A.; COLEMAN, M. B.; ADAMS, J. G. III; CASH, F. E.; STEINBERG, M. H. — Molecular basis for non-deletion α -thalassemia in American blacks $\alpha_2^{116GAG \rightarrow UAG}$. *J. Clin Invest.*, 80: 154. 1987.
- LIEBHABER, S. A. — α -Thalassemia. *Hemoglobin*, 13: 685. 1989.
- LIEBHABER, S. A.; GRIESE, E-U; WEISS, I.; CASH, F. E.; AYYUB, H.; HIGGS, D. R.; HORTS, J. — Inactivation of human α -globin gene expression by a de novo deletion located upstream of the α -globin gene cluster. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 87: 9431. 1990.
- LOWREY, H.; BODINE, D.; NIENHUIS, A. — Mechanisms of DNase I hypersensitivity site formation within the human globin locus control region. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 89: 1143. 1992.
- MAGRAM, J.; CHADA, K.; COSTANTINI, F. — Developmental regulation of a cloned adult β -globin gene in transgenic mice. *Nature*, 315: 338. 1985.
- MANIATIS, T.; GOODBOURN, S.; FISCHER, J. A. — Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science*, 236: 1237. 1987.

- MANTOVANI, R.; SUPERTI-FURGA, G.; GILMAN, J.; OTTOLENGHI, S. — The deletion of the distal CCAAT box region of the Ag globin gene in black HPFH abolishes the binding of the erythroid specific protein NF-E3 and the CCAAT displacement protein. *Nucl Acids Res*, 17: 6681. 1989.
- MARTIN, DIK; TSAI, S-F; ORKIN, S. H. — Increased gamma-globin expression in a nondeletion HPFH mediated by an erythroid-specific DNA binding factor. *Nature*, 338: 435. 1989.
- MARTIN, D. I.; ORKIN, S. H. — Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes Develop*, 4: 1886. 1990.
- MASTRANGELO, I.; COUREY, A.; WALL, J.; JACKSON, S.; HOUGH, V. — DNA looping and Sp1 multimer links: a mechanism for transcriptional synergism and enhancement. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 88: 5670. 1991.
- MICHELSON, A. M.; ORIN, S. H. — The 3' untranslated region of the duplicated human α -globin genes are unexpectedly divergent. *Cell*, 22: 371. 1980.
- MICHELSON, A. M.; ORKIN, S. H. — Boundaries of gene conversion within the duplicated human α -globin genes. *J. Biol. Chem*, 258: 15245. 1983.
- MIGNOTTE, V.; WALL, L.; DEBOER, E.; GROSVELD, F.; ROMEO, P.-H. — Two tissue-specific factors bind the erythroid promoter of the human porphobilinogen gene. *Nucl Acids Res*, 17: 37. 1989.
- MILNER, P. F.; CLEGG J. B.; WEATHERALL, D. J. — hemoglobin H disease due to a unique hemoglobin variant with an elongated α -chain. *Lancet*, 1: 729. 1971.
- MODELL, B.; BULYZHENKOV, V. — Distribution and control of some genetic disorders. *World Health Stat Quart*, 41: 209. 1988.
- MOI, P.; CASH, F. E.; LIEBHABER, S. A.; CAO, A.; PIRASTU, M. — An initiation codon mutation (AUG \rightarrow GUG) of the human α_1 -globin gene. *J. Clin Invest*, 80: 1416. 1987.
- MORLE, F.; LOPEZ, B.; HENNI, T.; GODET, J. — α -thalassemia associated with the deletion of two nucleotides at position -2 and -3 proceeding the AUG codon. *EMBO, J.*, 4: 1245. 1985.
- MURRU, S.; LOUDIANOS, G.; PORCU, S.; SCIARRATTA, G. V.; AGOSTI, S.; PARODI, M. I.; CAO, A.; PIRASTU, M. — A β -thalassaemia phenotype not linked to the β -globin cluster in an Italian family. *Brit. J. Haematol*, 81: 283. 1992.
- MYERS, R. M.; TLLY, K.; MANIATIS, T. — Fine structure genetic analysis of a β -globin promoter. *Science*, 232: 613. 1986.
- NATHAN, D. G.; GUNN, R. B. — Thalassemia: the consequences of unbalanced hemoglobin synthesis. *Am. J. Med.*, 41: 815. 1966.
- NEY, P. A.; SORRENTINO, B. P.; MCDONAGH, K. T.; NIENHUIS, A. W. — Tandem AP-1 binding sites within the human β -globin dominant control region function as an inducible enhancer in erythroid cells. *Genes Develop*, 4: 993. 1990a.
- NEY, P. A.; SORRENTINO, B. P.; LOWREY, C. H.; NIENHUIS, A.W. — Inducibility of the HS II enhancer depends on binding of an erythroid specific nuclear protein. *Nucl Acids Res*, 18: 6011. 1990b.
- NICHOLLS, R. D.; JONASSON, J. A.; MCGREE, J. O. D.; PATIL, S.; IONASESCU, V. V.; WEATHERALL, D. J.; HIGGS, D. R. — High resolution gene mapping of the human α -globin locus. *J. Med. Genet*, 24: 39. 1987a.
- OLIVIERI, N. F.; CHANG, L. S.; POON, A. O.; MICHRLSON, A. M., ORKIN, S. H. — An α -globin gene initiation codon mutation in a black family with Hb H disease. *Blood*, 70: 729. 1987.
- OPPENHEIMER, S. J.; HIGGS, D. R.; WETHERALL, D. J.; BARKER, J.; SPARK, R. A. — α -thalassemia in Papua New Guinea. *Lancet*, 1: 424. 1984.

- ORKIN, S. H.; OLD, J.; LAZARUS, H.; ALTAY, C.; GURGEY, A.; WEATHERALL, D. J.; NATHAN, D. G. — The molecular basis of α -thalassemias: frequent occurrence of dysfunctional α -loci among non-Asians with Hb H disease. *Cell*, 17: 33. 1979.
- ORKIN, S. H.; GOFF, S. C. — The duplicated human α -globin genes: their relative expression as measured by RNA analysis. *Cell*, 24: 345. 1981.
- ORKIN, S. H.; GOFF, S. C.; HECHTMAN, R. L. — Mutation in an intervening sequence splice junction in man. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 78: 5041. 1981.
- ORKIN, S. H. — Globin gene regulation and switching: Circa 1990. *Cell*, 63: 665. 1990.
- ORKIN, S. H. — GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood*, 80: 575. 1992.
- OTTOLENGHI, S.; LANYON, W. G.; PAUL, J.; WILLIAMSON, R. WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B.; PRITCHARD J.; POOTRAKUL, S.; BOON, W. H. — The severe form of α -thalassemia is caused by a hemoglobin gene deletion. *Nature*, 251: 389. 1974.
- PAGLIETTI, E.; GALANELLO, R.; MOI, P.; PIRASTU, M.; CAO, A. — Molecular pathology of haematology of haematology of haemoglobin H disease in Sardinians. *Brit J. Haematol*, 63: 485. 1986.
- PARKER, C. S.; TOPOL, J. — A *Drosophilla* RNA polymerase II transcription factor binds to the regulatory site of an HSP70 gene. *Cell*, 37: 273. 1984.
- PAULING, L. — The oxygen equilibrium of hemoglobin and its structural interpretation. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 21: 186. 1935.
- PEARSON, P. L.; KIDD, K. K.; WILLARD, H. F. — Report of the committee on human gene mapping by recombinant DNA techniques. *Cytogenet Cell Genet*, 46: 390. 1987.
- PERES, M. J.; SEIXAS, T.; CARVAJALES RAMOS, M.; GONÇALVES, J.; PACHECO, P.; LAVINHA, J. — Fenotipo β talassémico não ligado ao agrupamento génico da β -globina em interacção com hemoglobina S (resumo). 4.º Simpósio Hemoglobinopatias em Portugal: do Rastreo à Prevenção, Beja, 1993a.
- PERES, M. J.; CARREIRO, M. H.; MACHADO, M. C.; MAGALHÃES, H. A.; RAMOS ALMEIDA, J. M.; LAVINHA, J.; MARTINS, M. C. — Rastreo neonatal de drepanocitose e outras anomalias da hemoglobina. Estudo da incidência da α -talassémia (resumo). 4.º Simpósio Hemoglobinopatias em Portugal: do Rastreo à Prevenção, Beja, 1993a.
- PERKINS, N. D.; NICHOLAS, R. H.; PLUMB, M.; GOODWIN, G. H. — The purification of an erythroid protein which binds to enhancer and promoter elements of haemoglobin genes. *Nucl. Acids Res*, 17: 299. 1989.
- PERUTZ, M. F.; KENDREW, J. C.; WATSON, H. C. — Structure and function of hemoglobin: some relations between polypeptide chain configuration and amino acid sequence. *J. Mol. Biol.*, 13: 669. 1965.
- PESCHLE, C.; MAVILIO, F.; CARÈ, A.; MIGLIACCIO, G.; MIGLIACCIO, A. R.; SALVO, G.; SAMOGGIA, P.; PETTI, S.; GUERRIERO, R.; MARINUCCI, M.; LAZZARO, D.; RUSSO, G.; MASTROBERARDINO, G. — Haemoglobin switching in human embryos: asynchrony of $\zeta \rightarrow \alpha$ and $\epsilon \rightarrow \gamma$ -globin switches in primitive and definitive erythropoietic lineage. *Nature*, 313: 235. 1985.
- PHILIPSEN, S.; TALBOT, D.; FRASER, P.; GROSVELD, F. — The β -globin dominant region: hypersensitive site 2. *EMBO J.*, 9: 2159. 1990.
- PHILIPSEN, S.; PRUZINA, S.; GROSVELD, F. — The minimal requirements for activity in transgenic mice of hypersensitive site 3 of the beta globin locus control region. *EMBO J.*, 12: 1077. 1993.
- PIRASTU, M.; SAGLIO, G.; CHANG, J. C.; CAO, A.; KAN, Y. W. — Initiation codon mutation as a cause of α -thalassemia. *J. Biol. Chem*, 259: 12315. 1984.
- POON, R.; KAN, Y. W.; BOYER, H. W. — Sequence of the 3' noncoding and adjacent coding regions of human γ -globin mRNA. *Nucl. Acids Res*, 5: 4625. 1978.

- PROUDFOOT, N. J.; MANIATIS, T. — The structure of a human α -globin pseudogene and its relationship to α -globin gene duplication. *Cell*, 21: 537. 1980.
- PROUDFOOT, N. J.; GILL, A.; MANIATIS, T. — The structure of the human zeta-globin gene and a closely linked, nearly identical pseudogene. *Cell*, 31: 553. 1982.
- PRUZINA, S.; HANSCOMBE, O.; WHYATT, D.; GROSVELD, F.; PHILIPSEN, S. — Hypersensitive site 4 of the human β -globin locus control region. *Nucl. Acids Res*, 19: 1413. 1991.
- RACHMILEWITZ, E. A.; LUPIN, B. H.; SHOHET, S. B. — Lipid membrane peroxidation in β -thalassemia major. *Blood*, 47: 495. 1976.
- RAHUEL, C.; VINIT, M-A; LEMARCHANDEL, V.; CARTRON, J. P.; ROMEO, P. H. — Erythroid-specific activity of the glycophorin B promoter requires GATA-1 mediated displacement of a repressor. *EMBO J*, 11: 4095. 1992.
- RAICH, N.; ENVER, T.; NAKAMOTO, B.; JOSEPHSON, N.; PAPAYANNOPOULOS, T.; STAMATOYANNOPOULOS, G. — Autonomous developmental control of human embryonic globin switching in transgenic mice. *Science*, 250: 1147. 1990.
- RANDHAWA, Z. I.; JONES, R. T.; LIE-INJO, L. E. — Human hemoglobin Portland II ($\zeta_2\beta_2$). *J. Biol. Chem.*, 259: 7325. 1984.
- REDDY, P. M. S.; CHEN, C-KJ. — Protein-DNA interactions in vivo of an erythroid-specific, human β -globin locus enhancer. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 88: 8676. 1991.
- ROMÃO, L.; OLIM, G.; MARTINS, M. C.; RODRIGUES, V. R.; COUTINHO-GOMES, M. P.; LAVINHA, J. — Unusual molecular basis of hemoglobin H disease in the Azores Islands. *Hemoglobin*, 14: 607. 1990.
- ROMÃO, L.; OSÓRIO-ALMEIDA, L.; HIGGS, D. R.; LAVINHA, J.; LIEBHABER, S. A. — α -thalassemia resulting from deletion of regulatory sequences far upstream of the α -globin structural genes. *Blood*, 78: 1589. 1991.
- ROMÃO, L.; CASH, F.; WEISS, I.; LIEBHABER, S.; LOI, A.; PIRASTU, M.; GALANELLO, R.; PAGLIETTI, E.; CAO, A.; IOANNOU, P. — human α -globin gene expression is silenced by terminal truncation of chromosome 16p beginning immediately 3' of the ξ -globin gene. *Hum Genet*, 89: 323. 1992.
- ROMÃO, L. — Estudos de expressão dos genes do agrupamento da α -globina humana. Dissertação de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa. 1994.
- ROSS, J. PIZZARRO, A. — Human beta and delta globin messenger RNAs turn over at different rates. *J. Mol. Biol.*, 167: 607. 1983.
- ROSS, J.; SULLIVAN T. D. — Half-lives of beta and gamma globin messenger RNAs and of protein synthetic capacity in cultured human reticulocytes. *Blood*, 66: 1149. 1985.
- RYAN, T. M.; BEHRINGER, R. R.; MARTIN, N. C.; TOWNES, T. M.; PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L. — A single erythroid-specific DNase I super-hypersensitive site activates high levels of human β -globin gene expression in transgenic mice. *Genes Develop*, 3: 314. 1989a.
- RYAN, T. M.; BEHRINGER, R. R.; TOWNES, T. M.; PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L. — High-level erythroid expression of human alpha-globin genes in transgenic mice. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 86: 37. 1989b.
- SAFAYA, S.; RIEDER, R. F. — Dysfunctional α -globin gene in hemoglobin H disease in blacks. *J. Biol. Chem.*, 163: 4328. 1988.
- SANGUANSEMSRI, T.; MATRAGOON, S.; CHANGLOAH, L.; FLATZ, G. — Hemoglobin Suan-Dok ($\alpha_2^{109(G16)LEU \rightarrow ARG}$): An unstable variant associated with α -thalassemia. *Hemoglobin*, 3: 161. 1979.
- SCHWARTZ, E.; KAN, Y. W.; NATHAN, D. G. — Unbalanced globin chain synthesis in alpha-thalassemia homozygotes. *Ann NY Acad Sci*, 165: 288. 1969.

- SCHWARTZ, E.; BENZ, E. J. — The thalassemia syndromes. Churchill Livingstone, New York. 1991.
- SERJEANT, B. E.; MASON, K. P.; SERJEANT, G. R. — The development of hemoglobin A₂ in normal Negro infants and in sickle cell disease. *Brit J. Haematol*, 39: 259. 1978.
- SHAFIT-ZAGARDO, B.; BROWN, F. L.; MAIO, J. J.; ADAMS, J. W. — Kpn I families of long, interspersed repetitive DNAs associated with the human β -globin gene cluster. *Gene*, 20: 397. 1982.
- SHAKIN, S. H.; LIEBHABER, S. A. — Translational profiles of alpha-1, alpha-2, and beta-globin messenger ribonucleid acids in human reticulocytes. *J. Clin. Invest.*, 78: 1125. 1986.
- SHAKIN, S. H.; LIEBHABER, S. A. — Opposite responses of rabbit and human globin mRNAs to translational inhibition by cap analogues. *Biochemistry*, 26: 7188. 1987.
- SHAPIRO, M. B.; SENAPATHY, P. — RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucl Acids Res*, 15: 7155. 1987.
- SHARPE, J. A.; CHAN-THOMAS, P. S.; LIDA, J.; AYYUB, H.; WOOD, W. G.; HIGGS, D. R. — Analysis of the human α globin upstream regulatory element (HS-40) in transgenic mice. *EMBO J*, 11: 4564. 1992.
- SHAW, J-P; MARKS, J.; MOHANDAS, T.; SPARKES, R.; SHEN, C-KJ. — The adult α -globin gene loci from monkeys to man: the theta globin subfamily and the alpha globin duplication units in the old world monkeys. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 251: 65. 1987a.
- SHAW, J. P.; MARKS, J.; SHEN, C-KJ. — Evidence that the recently discovered theta globin gene is functional in higher primates. *Nature*, 326: 717. 1987b.
- SHEN, S.; SLIGHTOM, J. L.; SMITHIES, O. — A history of the human fetal globin duplication. *Cell*, 26: 191. 1981.
- SHIH, D.; WALL, R.; SHAPIRO, S. — Developmental regulated and erythroid-specific expression of the human embryonic β globin gene in transgenic mice. *Nucl Acids Res*, 18: 5465. 1990.
- SLATER, L. M.; MUIR, W. A.; WEED, R. I. — Influence of splenectomy on insoluble hemoglobin inclusions bodies in β -thalassemic erythrocytes. *Blood*, 31: 766. 1968.
- SLIGHTOM, J. L.; BLECHL, A. E.; SMITHIES, O. — Human fetal $\zeta\gamma$ and $\Lambda\gamma$ globin genes: complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes. *Cell*, 21: 627. 1980.
- SOPHOCLEOUS, T.; HIGGS, D. R.; ALDRIDGE, B; TRENT, R. J.; PRESSLEY, L.; CLEGG, J. B.; WEATHERALL, D. J. — The molecular basis for the hemoglobin Bart's hydrops fetalis syndrome in Cyprus. *Brit J Haematol*, 47: 153. 1981.
- SPANGLER, E. A.; ANDREWS, K. A.; RUBIN, E. M. — Developmental regulation of the human ζ -globin gene in transgenic mice. *Nucl Acids Res*, 18: 7093. 1990.
- SPRITZ, R. A.; DERIEL, J. K.; FORGET, B. G.; WEISSMAN, S. W. — Complete nucleotide sequence of the human δ -globin gene. *Cell*, 21: 639. 1980.
- STEINBERG, M. H.; COLEMAN, M. B.; PRESSLEY, A.; CASH, F. E.; ADAMS, J. G.; SANGUANERMSRI, T.; LIEBHABER, S. A. — Thalassemic expression of an α_2 -globin structural mutant (abstract). Twentyninth Annual Meeting of the American Society of Hematology, Washington, 1987.
- STRAUSS, E. C.; ANDREWS, N. C.; HIGGS, D. R.; ORKIN, S. H. — In vivo footprinting of the human α -globin locua upstream regulatory element by guanine and adenine ligation-mediated polymerase chain reaction. *Mol Cell Biol*, 12: 2135. 1992.
- STRAUSS, E.; ORKIN, S. — In vivo protein-DNA interactions at hypersensitive site 3 of the human beta globin locus control region. *Proc Nat Acad Sci USA*, 89: 5809. 1992.

- SU, W.; JACKSON, S.; TJIAN, R.; ECHOLS, H. — DNA looping between sites for transcriptional activation: self association of DNA-bound Sp1. *Genes Develop*, 5: 820. 1991.
- SUPERTI-FURGA, G.; BARBERIS, A.; SCHAFFNER, G.; BUSSLINGER, M. — -117 mutation in Greek HPFH affects the binding of three nuclear factors to the CCAAT region of the γ -globin gene. *EMBO J*, 7: 3099. 1988.
- TALBOT, D.; COLLIS, P.; ANTONIOU, M.; VIDAL, M.; GROSVELD, F.; GREAVES, D. R. — A dominant control region from the human beta-globin locus conferring integration site-independent gene expression. *Nature*, 338: 352. 1989.
- TALBOT, D.; PHILIPSEN, S.; FRASER, P.; GROSVELD, F. — Detailed analysis of the site 3 region of the human beta-globin dominant control region. *EMBO J*, 9: 2169. 1990
- TALBOT, D.; GROSVELD, F. — The HS2 of the globin locus control region enhances transcription through the interaction of a multimeric complex binding at two functionally distinct NF-E2 binding sites. *EMBO J*, 10: 1391. 1991.
- TOWNES, T. M.; LINGREL, J. B.; CHEN, H. Y.; BRINSTER, R. L.; PALMITER, R. D. — Erythroid-specific expression of human beta-globin genes in transgenic mice. *EMBO J*, 4: 1715. 1985.
- TRAINOR, C. D.; EVANS, T.; FELSENFELD, G.; BOGUSKI, M. S. — Structure and evolution of a human erythroid transcription factor. *Nature*, 343: 92. 1991.
- TRUDEL, M.; COSTANTINI, F. — A 3'-enhancer contributes to the stage-specific expression of the human β -globin gene. *Genes Develop*, 1: 954. 1987.
- TSAI, S-F; MARTIN, D. I. K.; ZON, L. I.; DÁNDREA, A. D.; WONG, G. G.; ORKIN, S. H. — Cloning of cDNA for major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature*, 339: 446. 1989.
- TSAI, S-F; STRAUSS, E; ORKIN, S. H. — Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes Develop*, 5: 919. 1991.
- TUAN, D; SOLOMON, D.; LI, Q.; LONDON, I. M. — The b-like globin gene domains in human erythroid cells. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 82: 6384. 1985.
- TUAN, D.; ABELIOVICH, A.; LEE-OLDHAM, M.; LEE, D. — Identification of regulatory elements of human β -like globin genes. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 251: 211. 1987.
- TUAN, D. Y.H.; SOLOMON, W. B.; LONDON, I. M.; LEE, D. — An erythroid-specific, developmental-stage-independent enhancer far upstream of the human " β -like-globin" genes. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 86: 2554. 1989.
- VALLOCH, V.; HOUSMAN, D. — Stability of globin mRNA in terminally differentiating murine erythroleukemia cells. *Cell*, 23: 509. 1981.
- VAN ASSENDELFT, G. B.; HANSCOMBE, O; GROSVELD, F.; GREAVES, D. R. — The beta-globin dominant control region activates homologous and heterologous promoters in a tissue-specific manner. *Cell*, 56: 969. 1989.
- VAN DER PLOOG, L. H. T.; KONINGS, A.; OORT, M.; ROOS, D.; BERNINI, L.; FLAVELL, R. A. — $\gamma\beta$ -thalassemia studies showing that deletion of the γ - and δ - genes influences β -globin gene expression in man. *Nature*, 283: 637. 1980.
- VANDYKE, M. W.; ROEDER, R. G.; SAWADOGO, M. — Physical analysis of transcription preinitiation complex assembly on a class II gene promoter. *Science*, 241: 1335. 1988.
- VIGNAL, A.; LONDON, J.; RAHUEL, C.; CARTRON, J-P. — Promoter sequence and chromosomal organization of the genes encoding glycoporphins A, B, and E. *Gene*, 95: 289. 1990.
- VYAS, P.; VICKERS, M. A.; SIMMONS, D. L.; AYYUB, H.; CRADDOCK, C. F.; HIGGS, D. R. — Cis-acting sequences regulating expression of the human α -globin cluster lie within constitutively open chromatin. *Cell*, 69: 781. 1992.

- WALL, L.; DEBOER, E.; GROSVELD, F. — The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes Develop*, 2: 1089. 1988.
- WATT, P.; LAMB, P.; SQUIRE, L.; PROUDFOOT, N. — A factor binding GATAAG confers tissue specificity on the promoter of the ζ -globin gene. *Nucl Acids Res*, 18: 1339. 1990.
- WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B.; NA-NAKORN, S.; WASI P. — The pattern of disordered hemoglobin synthesis in homozygous and heterozygous β -thalassemia. *Brit J. Haematol*, 16: 251. 1969.
- WEATHERALL, D. J.; AND CLEGG, J. B. — *The Thalassemia Syndromes*. 3rd edn, Blackwell Scientific Publication, Oxford. 1981.
- WEATHERALL, D. J. — *The thalassemias*. 3rd edn, McGraw Hill, New York, 1983.
- WEATHERALL, D. J.; HIGGS, D. R.; CLEGG, J. B.; HILL, A. V. S.; NICHOLLS, R.; WAINSCOT, J. S. — The relationship between the common mutations of the alpha gene cluster and its evolutionary history. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 218: 47. 1986.
- WHITELAW, E.; PROUDFOOT, N. J. — transcriptional activity of the human pseudogene Ψ -globin compared with α -globin, its functional gene counterpart. *Nucl Acids Res*, 11: 7717. 1983.
- WHITELAW, E.; HOGBEN, P.; HANSCOMBE, O.; PROUDFOOT, N. J. — Transcriptional promiscuity of the human α -globin gene. *Mol Cell Biol*, 9: 241. 1989a.
- WICKRAMASINGHE, S. N.; LETSKY, E.; MOFFATT, B. — Effect of α -chain precipitates on bone marrow function in homozygous β -thalassemia. *Brit J. Haematol*, 25: 123. 1973.
- WILKIE, A. O. M.; LAMB, J.; HARRIS, P. C.; FINNEY, R. D.; HIGGS, D. R. — A truncated human chromosome 16 associated with alpha thalassemia is stabilized by addition of telomeric repeat (TTAGGG). *Nature*, 346: 868. 1990.
- WINCHAGOON, P.; HIGGS, D. R.; GOODBOURN, S. E. Y.; CLEGG, J. B.; WEATHERALL, D. J.; WASI, P. — The molecular basis of α -thalassemia in Thailand. *EMBO J.*, 3: 1813. 1984.
- YAGI, M.; GELINAS, R.; ELDER, J. T.; PERETZ, M.; PAPAYANNOPOULOU, T.; STAMATOYANNOPOULOS, G.; GROUDINE, M. — Chromatin structure and developmental expression of the human α -globin cluster. *Mol Cell Biol*, 6: 1108. 1986.
- YAMAMOTO, M.; KO, L. J.; LEONARD, M. W.; BEUG, H.; ORKIN, S. H.; ENGEL, J. D. — Activity and tissue specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family. *Genes Develop*, 4: 1650. 1990
- YATAGANAS, X.; FESSAS, P. — The pattern of hemoglobin precipitation in thalassemia and its significance. *Ann NY acad Sci*, 165: 270. 1969.
- YU, C-Y.; CHEN, J.; LIN L-I; TAM, M.; SHEN, C-KJ. — Cell type-specific protein-DNA interactions in the human zeta-globin upstream promoter region: displacement of Sp1 by the erythroid cell-specific factor NF-E1. *Mol Cell Biol*, 10: 282. 1990.
- YU, C-Y; MOTAMED, K.; CHEN, J.; BAILEY, A. D.; SHEN, C-KJ. — The CACC box upstream of human embryonic ϵ -globin gene binds Sp1 and is a functional promoter element in vitro and in vivo. *J. Biol Chem*, 266: 8907. 1991.
- ZHANG, Q.; REDDY, P. M. S.; YU, C-Y; BASTIANI, C.; HIGGS, D.; STAMATOYANNOPOULOS, G.; PAPAYANNOPOULOS, T.; SHEN, C-KJ. — Transcriptional activation of human ζ_2 globin promoter by the α globin regulatory element (HS-40): functional role of specific nuclear factor-DNA complexes. *Mol Cell Biol*, 13: 2298. 1993.
- ZON, LI; TSAI, S-F; BURGESS, S; MATSUDAIRA, P.; BURNS, G. P.; ORKIN, S. H. — The major human erythroid DNA binding protein (GF-1): primary sequence and localization of the gene to the X-chromosome. *Proc Nat Acad Sci USA*, 87: 668. 1990.

ÍNDICES DOS VOLUMES XIII-XVI (1992-1995)

A. ÍNDICE POR ASSUNTOS

IN MEMORIAM

	<i>Vol.-Pág.</i>
Homenagem ao Prof. Doutor José Antunes Serra	XIII- 5
Palavras Introdutórias	XIII- 7
por <i>J. A. Quartau</i>	
O Professor Antunes Serra, um verdadeiro Mestre	XIII- 9
por <i>Miguel Pereira Coutinho</i>	
Três palavras sobre o Professor José Antunes Serra	XIII- 13
por <i>F. Fernando Almeida</i>	
A contribuição fundamental do Professor José Antunes Serra na Genética do melhoramento dos ovinos	XIII- 15
por <i>J. C. Antunes-Correia</i>	
Algumas palavras e recordações de homenagem ao Prof. José Antunes Serra	XIII- 19
por <i>Maria de Lourdes Sampaio Silva</i>	
Breve mas intenso contacto com o Prof. J. A. Serra	XIII- 23
por <i>J. M. de Campos Rosado</i>	
Como conheci o Senhor Professor Serra. Uma experiência de treze anos	XIII- 27
por <i>João A. M. Corte-Real</i>	
As primeiras fases da obra científica do Prof. J. A. Serra	XIII- 33
por <i>Carlos Almaça</i>	
Centenário de Aurélio Quintanilha	XIV- 5
(1892-1992)	
Palavras de abertura	XIV- 7
por <i>Maria Luísa Neves de Azevedo</i>	
Como vejo a figura do Professor Quintanilha	XIV- 9
por <i>Miguel Pereira Coutinho</i>	

«Conhece le verrier?»	
Um apontamento sobre Aurélio Quintanilha por <i>Henrique Guedes-Pinto</i>	XIV- 15
No Centenário de Aurélio Quintanilha por <i>Fernando Catarino</i>	XIV- 19
Importância da obra de Quintanilha na Genética por <i>Clara de Barros Queiroz</i>	XIV- 23
Mestre Quintanilha faz-se aluno por <i>Luís Archer</i>	XIV- 29
Aurélio Quintanilha	
Algumas recordações do Mestre, do Cidadão e do Amigo por <i>António de Barros Machado</i>	XIV- 33
As minhas memórias do Professor A. Quintanilha por <i>António Viveiros de Bettencourt</i>	XIV- 43
No Centenário de Aurélio Quintanilha	
Recordação de alguns encontros por <i>Miguel Mota</i>	XIV- 47
Perfil de Aurélio Quintanilha por <i>Vitorino Nemésio</i>	XIV- 55
Prof. Doutor Abílio Fernandes por <i>Luís Archer</i>	XVI- 5
Como nasceu a homenagem a Joaquim Vieira Natividade por <i>Maria Luísa Azevedo Neves</i>	XVI- 7
Natividade e a Genética por <i>Miguel Mota</i>	XIV- 3
Eng.º J. Vieira Natividade – O cientista e o poeta da natureza por <i>Maria Virgínia Monteiro</i>	XIV- 25
TEMAS EM FOCO	
Forum Mendel BRNO 1992 por <i>R. M. Albuquerque de Matos</i>	XV- 5
Técnicas Laboratoriais de Biologia: Um deslumbramento pedagógico por <i>José Manuel Rodrigues Bonito</i>	XV- 99

A alimentação do mundo no próximo século. I — Introdução	XVI- 97
por <i>T. Mello-Sampayo</i>	

ARTIGOS GERAIS DE REVISÃO

A hereditariedade do síndrome da morte súbita e inexplicada do lactente (MSIL) e a sua relação com a Apneia do Sono Infantil	XIII- 41
por <i>Jorge Sequeiros</i>	

Estudo experimental do <i>Solanum Fastigiatum</i> Will. Perspectivas Farmacológicas e Genéticas	XIII- 85
por <i>Sousa I., Dihel, E. E., Almeida, L. M., Zagalo-Cardoso, J. A., Cardoso, M. A. e Carvalheira, A. F.</i>	

As novas tendências do melhoramento genético de plantas na década de 90	XIII-141
por <i>Francisco Bagulho</i>	

Terapia Génica 92	XIV- 67
por <i>Luis Archer</i>	

A importância de ser bactéria	XIV-129
por <i>A. Madeira-Lopes</i>	

Ímanes vivos, Evolução Energética e Origem da Vida	XV-103
por <i>A. Madeira-Lopes</i>	

Glossário de Genética Médica	XV-109
por <i>Fernando J. Regateiro</i>	

A alimentação do mundo no próximo século. II — A situação da agricultura no sudoeste Asiático e nos países menos desenvolvidos	XVI- 99
por <i>M. S. Swaminathan</i>	

A alimentação do mundo no próximo século. III — Progressos da Biologia Molecular por <i>Richard Flavell</i>	XVI-111
---	---------

Expressão dos genes do agrupamento da α -globina humana	XVI-123
por <i>Luisa Romão</i>	

ARTIGOS DE INVESTIGAÇÃO

Genes for L-Arabinose utilization in <i>Bacillus subtilis</i>	XIII-149
por <i>Helena Paveia and Luis Archer</i>	

Mapping of ara genes in <i>Bacillus subtilis</i>	XIII-161
por <i>Helena Paveia and Luis Archer</i>	

Histological study of the heterozigosity effect of coffee resistance genes SH ₁ and SH ₂ , SH ₃ Towards <i>Hemileia vastatrix</i> por <i>Maria do Céu Silva, Luisete Rijo, C. J. Rodrigues Jr. e Maria Isabel Vasconcelos</i>	XIII-169
Factores genéticos que condicionam a resistência às raças de <i>Hemileia vastatrix</i> Berk et Br. dos Clones-Tipo dos grupos 1, 2 e 3 de derivados de híbrido de Timor por <i>A. J. Bettencourt, J. Lopes e S. Palma</i>	XIII-185
Fibrose Quística em Portugal: Patologia Molecular e Diagnóstico Pré-Natal por <i>Duarte, Angela Hagenfeldt, Manuela Pacheco, Paula Madureira, Margarida Silva, Conceição e Lavinha, João</i>	XIV- 87
Assessment of specific genotype x environment Interactions in <i>Lupinus luteus</i> por <i>L. Gusmão, D. Coelho Rebelo, M. J. Miranda, J. Baeta e F. Vaz</i>	XIV-141
Electroforese em gel de poliacrilamida - SDS das proteínas de reserva do trigo (aperfeiçoamento de um método)..... por <i>Cristina Simões, Zaida Cunha e T. Mello-Sampayo</i>	XIV-145
New basic chromosome number and meiotic analysis of two species of genus <i>Hedyotis</i> (Rubiaceae) por <i>A. R. P. Sinha and Krishna Kumar</i>	XIV-151
New chromosome counts of an endemic species of andamans por <i>A. R. P. Sinha and Lata Rani Mazumdar</i>	XIV-157
A dermatoglyphic study of Jordanian populations: Part II: Palmar configurations por <i>Yousif I. Omari</i>	XIV-161
Estudo Histológico Comparativo das reacções de resistência à <i>Hemileia vastatrix</i> em <i>Coffea canephora</i> e <i>Coffea congensis</i> por <i>Luisete Rijo, Maria do Céu Silva e Maria Isabel Vasconcelos</i>	XV- 9
Distribution of Some Helicid Suails in Portugal por <i>R. M. Albuquerque de Matos</i>	XV- 29
New Basic Chromosome Number and Cytology of some endemic plants of Andaman and Nicobar Islands (Índia) por <i>A. R. P. Sinha and O. P. Chaurasia</i>	XV- 37
New Basic Chromosome Number and cytology of some Euphorbiaceous plants of daman forest (Índia) por <i>A. R. P. Sinha and Lata Rani Mazumdar</i>	XV- 43
A Dermatoglyphic Study of Jordanian Populations Part III: Palmar a-b Ridge Count por <i>Yousif I. Omari</i>	XV-139
Meiotic Analsi and report of new chromosome number of some endemic Plants of Andamans and Nicobars Forest (Índia) por <i>A. R. P. Sinha</i>	XV-147

- Electrophoresis on differentiation of *Discosporium populeum* (Sacc.) Sutton isolates por *Maria N. S. Santos, Maria E. M. Guedes, L. Guerra-Guimarães* XVI- 29
- Studies on yield stability and quality parameters of European bred wheats por *Bagulho, F.; Maças, B.; Brites, C. and Coutinho, J.* XVI- 35
- Frequência genotípica e alélica do polimorfismo do gene cy P2D6 do citocromo P450 na população portuguesa por *Fernando J. Regateiro, Alice Pêgo, Paula Mota, Ana Martins, Natércia Conceição, Filipa Carvalho, Ana Reino, Clara Gomes, Maria G. A. Vieira, Amélia Sousa, Mário Loureiro, A. Almeida Santos e A. Robalo Cordeiro* XVI- 43
- A Dermatoglyphic Study of Jordanian populations - Part IV: Triradial Positions por *Yousif I. Omari* XVI- 49

NOTAS E NOTÍCIAS

- 3rd Internationale Triticale Symposium XIV-167
- Assembleia Geral da Sociedade Portuguesa de Genética (25 Junho 1993) XV- 49
- Federação das Sociedades Europeias de Genética (FEES) XV- 57

ANÚNCIO

- Genes and chromosomes «meetings» organizados por The Genetic Society (Reino Unido) - (Swam sea, 29 a 31 Março 1994) XV- 59
- XXX Jornadas Luso-Espanholas de Genética XVI- 59

B. ÍNDICE POR AUTORES

Vol.-Pág.

- ALMAÇA, Carlos**
 — As primeiras fases da obra científica do Prof. J. A. Serra..... XIII- 33
- ALMEIDA, F. Fernando de**
 — Três palavras sobre o Professor José Antunes Serra..... XIII- 13
- ALMEIDA, L. M.**
 — Ver Sousa, I. *et al.*..... XIII- 85
- ANTUNES-CORREIA, J. C.**
 — A contribuição fundamental do Professor José Antunes Serra na Genética do melhoramento dos ovinos..... XIII- 15
- ARCHER, Lutz**
 — Homenagem ao Prof. Doutor José Antunes Serra..... XIII- 5
 — Ver Paveia, Helena..... XIII-149
 — Ver Paveia, Helena..... XIII-161
 — Centenário de Aurélio Quintanilha (1892-1992)..... XIV- 5
 — Mestre Quintanilha faz-se aluno..... XIV- 29
 — Terapia Génica 92..... XIV- 67
 — Prof. Doutor Abílio Fernandes..... XVI- 5
- BAETA, J.**
 — Ver Gusmão, L. *et al.*..... XIV-141
- BAGULHO, Francisco**
 — As novas tendências do melhoramento genético de plantas na década de 90..... XIII-141
 — Studies on yield stability and quality parameters of European bread wheats..... XVI- 35
- BETTENCOURT, A. J.**
 — Factores genéticos que condicionam a resistência às raças de Hemileia Vastatrix Berk et Br. dos Clones-Tipo dos grupos 1, 2 e 3 de derivados de híbrido de Timor..... XIII-185
- BONITO, José Manuel Rodrigues**
 — Técnicas Laboratoriais de Biologia: Um deslumbramento pedagógico..... XV- 99
- BRITES, C.**
 — Ver Bagulho, Francisco..... XVI- 35

<i>CARDOSO, M. A.</i>	
— Ver Sousa, I.	XIII- 85
<i>CARVALHEIRA, A. F.</i>	
— Ver Sousa, I.	XIII- 85
<i>CARVALHO, Filipa</i>	
— Ver Regateiro, Fernando J.	XVI- 43
<i>CATARINO, Fernando</i>	
— No Centenário de Aurélio Quintanilha	XIV- 19
<i>CHAURASIA, O. P.</i>	
— Ver Sinha, A. R. P.	XV- 37
<i>CONCEIÇÃO, Natércia</i>	
— Ver Regateiro, Fernando J.	XVI- 43
<i>CORDEIRO, A. Robalo</i>	
— Ver Regateiro, Fernando J.	XVI- 43
<i>CORTE-REAL, João A. M.</i>	
— Como conheci o Senhor Professor Serra. Uma experiência de treze anos	XIII- 27
<i>COUTINHO, Miguel Pereira</i>	
— O Professor Antunes Serra, um verdadeiro Mestre	XIII- 9
— Como vejo a figura do Professor Quintanilha	XIV- 9
<i>COUTINHO, J.</i>	
— Ver Bagulho, F.	XVI- 35
<i>CUNHA, Zaida</i>	
— Ver Simões, Cristina	XIV-145
<i>DIHEL, E. E.</i>	
— Ver Sousa, I.	XIII- 85
<i>DUARTE, Ângela</i>	
— Fibrose Quística em Portugal: Patologia Molecular e Diagnóstico Pré-Natal	XIV- 87
<i>FLAVELL, Richard</i>	
— A alimentação do mundo no próximo século. II-A situação da agricultura no Sudoeste Asiático e nos países menos desenvolvidos	XVI-111
<i>GOMES, Clara</i>	
— Ver Regateiro, Fernando J.	XVI- 43
<i>GUEDES, Maria E. M.</i>	
— Ver Santos, Maria N. S.	XIV- 29

<i>GUEDES-PINTO, Henrique</i>	
— «Conhece le verrier?» – Um apontamento sobre Aurélio Quintanilha.....	XIV- 15
<i>GUERRA-GUIMARÃES, L.</i>	
— Ver Santos, Maria N. S.	XVI- 29
<i>GUSMÃO, L.</i>	
— Assessment of specific genotype x environment Interactions in Lupinus lutens.....	XIV-141
<i>HAGENFELDT, Manuela</i>	
— Ver Duarte, Ângela	XIV- 87
<i>KUMAR, Krishna</i>	
— Ver Sinha, A. R. P.	XIV-151
<i>LAVINHA, João</i>	
— Ver Duarte, Ângela	XIV- 87
<i>LOPES, J.</i>	
— Ver Bettencourt, A. J.	XIII-185
<i>LOUREIRO, Mário</i>	
— Ver Regateiro, Fernando J.	XVI- 43
<i>MAÇÃS, B.</i>	
— Ver Bagulho, F.	XVI- 35
<i>MACHADO, António de Barros</i>	
— Aurélio Quintanilha – Recordações do Mestre, do Cidadão e do Amigo	XIV- 33
<i>MADEIRA-LOPES, A.</i>	
— A importância de ser bactéria	XIV- 3
— Ímanes vivos, Evolução Energética e Origem da Vida	XV-103
<i>MADUREIRA, Margarida</i>	
— Ver Duarte, Ângela	XIV- 87
<i>MARTINS, Ana</i>	
— Ver Regateiro, Fernando J.	XVI- 43
<i>MATOS, R. M. Albuquerque</i>	
— Forum Mendel BRNO 1992	XV- 5
— Distribution of Some Helicid Sualis in Portugal	XV- 29
<i>MAZUMDAR, Lata Rani</i>	
— Ver Sinha, A. R. P.	XV- 43
<i>MELLO-SAMPAYO, T.</i>	
— Ver Simões, Cristina	XIV-145
— A alimentação do mundo no próximo século I-Introdução	XVI- 97

<i>MIRANDA, M. S.</i>	
— Ver Gusmão, L.	XIV- 141
<i>MONTEIRO, Maria Virgínia</i>	
— Eng. J. Vieira Natividade – O cientista e o poeta da natureza	XVI- 25
<i>MOTA, Miguel</i>	
— No Centenário de Aurélio Quintanilha – Recordação de alguns encontros	XIV- 47
— Natividade e a Genética	XVI- 13
<i>MOTA, Paula</i>	
— Ver Regateiro, Fernando J.	XVI- 43
<i>NEMÉSIO, Vitorino</i>	
— Perfil de Aurélio Quintanilha	XIV- 55
<i>NEVES, Maria Lusa Azevedo</i>	
— Palavras de Abertura	XIV- 7
— Como nasceu a homenagem a Joaquim Vieira Natividade	XVI- 7
<i>OMARI, Yousif I.</i>	
— A dermatoglyphic study of Jordanian populations: Part II: Palmar configurations	XIV-161
— A Dermatoglyphic Study of Jordanian Populations Part III: Palmar a-b Ridge Count	XV-139
— A Dermatoglyphic Study of Jordanian Populations Part IV: Triradial positions	XVI- 49
<i>PACHECO, Paula</i>	
— Ver Duarte, Ângela	XIV- 87
<i>PALMA, S.</i>	
— Ver Bettencourt, A. J.	XIII-185
<i>PAVEIA, Helena</i>	
— Genes for L-Arabinose in <i>Bacillus subtilis</i>	XIII-149
— Mapping of ara genes in <i>Bacillus subtilis</i>	XIII-161
<i>PEGO, Alice</i>	
— Ver Regateiro, Fernando J.	XVI- 43
<i>QUARTAU, J. A.</i>	
— Palavras Introdutórias	XIII- 7
<i>QUEIROZ, Clara de Barros</i>	
— Importância da obra de Quintanilha na Genética	XIV- 23
<i>REBELO, D. Coelho</i>	
— Ver Gusmão, L.	XIV-141

	Vol.-Pág.
REGATEIRO, Fernando J.	
— Glossário de Genética Médica	XV-109
— Frequência genotípica e alélica do polimorfismo do Gene <i>cy P₂ D₆</i> do Citocromo P450 na população portuguesa	XVI- 43
REINO, Ana	
— Ver Regateiro, Fernando J.	XVI- 43
RIJO, Luisete	
— Ver Silva, Maria do Céu	XIII-169
— Estudo Histológico Comparativo das reacções de resistência à Hemileia vastatrix em <i>Coffea canephora</i> e <i>Coffea congestica</i>	XV- 9
RODRIGUES, C. J.	
— Ver Silva, Maria do Céu	XIII-169
ROMÃO, Lúsa	
— Expressão dos genes do agrupamento da α -globina humana	XVI-123
ROSADO, J. M. de Campos	
— Breve mas intenso contacto com o Prof. J. A. Serra	XIII- 23
SANTOS, A. Almeida	
— Ver Regateiro, Fernando, J.	XVI- 43
SANTOS, Maria N. S.	
— Electrophoresis on differentiation of <i>Discosporium populeum</i> (SACC.) Sutton isolates	XVI- 29
SEQUEIROS, Jorge	
— A hereditariedade do síndrome da morte súbita e inexplicada do lactente (MSIL) e sua relação com a Apneia do Sono Infantil	XIII- 41
SILVA, Conceição	
— Ver Duarte, Ângela	XIV- 87
SILVA, Maria do Céu	
— Histological study of the heterozygosity effect of coffee resistance genes SH ₁ , and SH ₄ , SH ₅ Towards <i>Hemileia vastatrix</i>	XIII-169
SILVA, Maria Lourdes Sampaio	
— Algumas palavras e recordações de homenagem ao Prof. José Antunes Serra	XIII- 19
SIMÕES, Cristina	
— Electroforese em gel de poliacrilamida - SDS das proteínas de reservas do trigo (aperfeiçoamento de um método)	XIV-145
SINHA, A. B. P.	
— New basic chromosome number and meiotic analysis of two species of genus <i>Hedyotis</i> (Rubiaceae)	XIV-151

	Vol.-Pág.
— New chromosome counts of an endemic species of andamans	
— New Basic Chromosome Number and cytology of some endemic plants of Andaman and Nicobar Islands (Índia)	XIV-157
— New Basic Chromosome Number and cytology of some Euphorbiaceous plants of daman forest (Índia)	XV- 37
— Meiotic Analysis and report of new chromosome number of some endemic Plants of Andamans and Nicobars Forest (Índia)	XV- 43
	XV-147
SOUSA, I.	
— Estudo experimental do <i>Solanum Fastigiatum</i> Will. Perspectivas Farmacológicas e Genéticas	XIII- 85
SOUSA, Amélia	
— Ver Regateiro, Fernando J.	XVI- 43
SWAMINATHAN, M. S.	
— A alimentação do mundo no próximo século II-A situação da agricultura no sudoeste Asiático e nos países menos desenvolvidos	XVI- 99
VASCONCELOS, Maria Isabel	
— Ver Silva, Maria do Céu	
— Ver Rijo, Luisete	XIII-169
	XV- 9
VAZ, F.	
— Ver Gusmão, L.	XIV-141
VIEIRA, Maria G. A.	
— Ver Regateiro, Fernando J.	XVI- 43
ZAGALO, Cardoso, J. A.	
— Ver Sousa, I.	XIII- 85



SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA

INFORMA QUE:

1. A revista Brotéria-Genética é distribuída gratuitamente aos sócios da S. P. G.
2. A quota actual de sócio da S. P. G. é de mil e novecentos escudos anuais.
3. Se pretender tornar-se sócio da S.P.G., deve enviar, devidamente preenchida, a «Proposta para Sócio» que abaixo se inclui para:

SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA
Departamento de Genética
Faculdade de Ciências Médicas, U.N.L.
R. da Junqueira, 96 — 1300 LISBOA
Telefs. 364 50 83 - 363 21 41

SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA

PROPOSTA PARA SÓCIO

Nome _____

Profissão _____

Morada (para o envio de correspondência e cobrança de quotas) _____

Data ____/____/____

Assinatura _____

SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA



1. ASSOCIAÇÃO

1. A revista *Biotética-Genética* é distribuída gratuitamente aos sócios da S.P.G.

2. ADOÇÃO

2. A quota anual de sócio da S.P.G. é de mil e novecentos escudos anuais.

3. Se pretender tornar-se sócio da S.P.G., deve enviar, devidamente preenchida, a «Proposta para Sócio» que serixo se inclui para análise.

4. A proposta para sócio deve ser enviada para o Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, U.N.L., R. da Junqueira, 82 - 1300 LISBOA.

5. A proposta para sócio deve ser enviada para o Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, U.N.L., R. da Junqueira, 82 - 1300 LISBOA.

6. A proposta para sócio deve ser enviada para o Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, U.N.L., R. da Junqueira, 82 - 1300 LISBOA.

7. A proposta para sócio deve ser enviada para o Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, U.N.L., R. da Junqueira, 82 - 1300 LISBOA.

8. A proposta para sócio deve ser enviada para o Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, U.N.L., R. da Junqueira, 82 - 1300 LISBOA.

9. A proposta para sócio deve ser enviada para o Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, U.N.L., R. da Junqueira, 82 - 1300 LISBOA.

10. A proposta para sócio deve ser enviada para o Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, U.N.L., R. da Junqueira, 82 - 1300 LISBOA.

11. A proposta para sócio deve ser enviada para o Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, U.N.L., R. da Junqueira, 82 - 1300 LISBOA.

12. A proposta para sócio deve ser enviada para o Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, U.N.L., R. da Junqueira, 82 - 1300 LISBOA.

13. A proposta para sócio deve ser enviada para o Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, U.N.L., R. da Junqueira, 82 - 1300 LISBOA.

14. A proposta para sócio deve ser enviada para o Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, U.N.L., R. da Junqueira, 82 - 1300 LISBOA.

15. A proposta para sócio deve ser enviada para o Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, U.N.L., R. da Junqueira, 82 - 1300 LISBOA.

16. A proposta para sócio deve ser enviada para o Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, U.N.L., R. da Junqueira, 82 - 1300 LISBOA.

17. A proposta para sócio deve ser enviada para o Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, U.N.L., R. da Junqueira, 82 - 1300 LISBOA.

18. A proposta para sócio deve ser enviada para o Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, U.N.L., R. da Junqueira, 82 - 1300 LISBOA.

19. A proposta para sócio deve ser enviada para o Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, U.N.L., R. da Junqueira, 82 - 1300 LISBOA.



SOCIEDADE PORTUGUESA DE GENÉTICA

FICHA DA ACTIVIDADE DOS SÓCIOS

N.B. - Dactilografar ou preencher com maiúsculas

Nome:

Direcção: Instituição (Dep. Fac. Univ. Escl.)

.....

.....

..... Código Postal

Residência

.....

..... Código Postal

Actividades: Ensino - Secundário

Universitário

- Investigação
- 1. Citogenética
 - 2. Genética Molecular e Microbiana
 - 3. Genética e Melhoramento de Plantas
 - 4. Genética e Melhoramento Animal
 - 5. Genética Humana
 - 6. Genética das Populações e Evolutiva
 - 7. Genética da Diferenciação e Desenvolvimento

Linhas de Investigação em que trabalha (não exceder três linhas)

.....

.....

Assinatura Data

Enviar esta ficha preenchida para:

Dr.ª Maria José Marinho
Instituto Gulbenkian de Ciência
Apartado 14
2781 Oeiras Codex