



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estudo de polimorfismos associados ao aumento da expressão de Hemoglobina Fetal (HbF)

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Augusto Manuel Elias Abade (Universidade de Coimbra) e do Doutor Licínio Manuel Mendes Manco (Universidade de Coimbra)

Clara Inês Antunes Pereira

2013

“A ciência realmente só tem alcançado tornar mais intensa e forte uma certeza: - a velha certeza socrática da nossa irreparável ignorância. De cada vez sabemos mais - que não sabemos nada.”

—Eça de Queiroz

Agradecimentos

Gostaria de Agradecer:

ao Doutor Licínio Manuel Mendes Manco pela orientação, disponibilidade, ajuda e paciência;

ao Professor Doutor Augusto Manuel Elias Abade pelo seu contributo e orientação;

à Sandra Toste pela amizade, companhia e apoio, essencial nos momentos passados no laboratório e fora dele;

aos meus pais por me aturarem, apoiarem e evidentemente, financiarem;

à minha irmã pelo apoio e companheirismo, apesar da consumição, e por me levar à exaustão da minha serenidade pela sua preguiça;

ao Sr. António pelos momentos de lazer e descontração proporcionados e acolhimento na sua casa;

à Ana Maria Barraca e João Neto, pela sua boa disposição e amizade;

à minha tia, por estar presente e apoiar sempre que necessário;

à D. Fernanda e Sr. António Barraca pela sua eterna juventude, boa disposição e carinho pelos mais jovens;

à Caetana Barraca, por ser uma criança alegre e contribuir para a boa disposição daqueles que a rodeiam;

ao resto da família, que apesar de não estarem aqui mencionados, contribuíram de alguma forma para a minha formação pessoal;

a todos os meus restantes amigos, especialmente aqueles que deixaram Coimbra, pela boa disposição, companheirismos e momentos especiais proporcionados durante a vida estudantil;

à Nandinha, por todos os conselhos e carinho;

e, por fim, ao João por tudo o que significa para mim, por estar incondicionalmente presente, pela cumplicidade, pelo afeto, pela paciência e pelos cozinhados.

Resumo

Estudo de polimorfismos associados ao aumento da expressão de Hemoglobina Fetal (HbF)

Clara Inês Antunes Pereira

Palavras-Chave: Hemoglobina Fetal (HbF), População Portuguesa, Polimorfismos, Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (HPFH), β -talassemia, Drepanocitose, *cluster* β -globínico, BCL11A, HMIP, XmnI

Hemoglobinopatias devidas a mutações no gene β -globínico são responsáveis por doenças monogénicas muito comuns no mundo, nomeadamente drepanocitose e β -talassemia.

A forma de hemoglobina presente em maiores concentrações no adulto (cerca de 95%) é a hemoglobina A (HbA; $\alpha_2\beta_2$), estando presentes em menor percentagem a hemoglobina A2 (HbA2; $\alpha_2\delta_2$) (2-3,5%) e a hemoglobina fetal (HbF; $\alpha_2\gamma_2$) (<2%). Durante o desenvolvimento fetal e primeiros meses de vida, a hemoglobina que predomina é a HbF. Em alguns doentes com hemoglobinopatias por mutações no gene β -globínico, nomeadamente na drepanocitose e β -talassemia, verifica-se um aumento dos níveis de HbF. A síntese aumentada de cadeias gama globínicas também persiste para além do nascimento em alguns adultos com parâmetros hematológicos normais, levando a que os níveis de HbF permaneçam elevados durante toda a vida; esta condição é conhecida como persistência hereditária de HbF (HPFH).

O estudo da regulação dos níveis de HbF nos glóbulos vermelhos tem elevada importância clínica, na medida em que a persistência de HbF em doentes com drepanocitose e β -talassemia se traduz num benefício clínico importante, pois a sua presença compensa a redução de outras hemoglobinas funcionais. Através de estudos de associação, foram identificados três *loci* principais envolvidos na regulação da expressão dos genes gama: o gene BCL11A no cromossoma 2p16, a região intergénica HBS1L-MYB (HMIP) no cromossoma 6q23, e o SNP XmnI na região promotora do gene HBG2 no cromossoma 11p15.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a associação aos níveis de HbF de alguns polimorfismos previamente descritos nestes três *loci* em diferentes grupos populacionais de indivíduos de naturalidade Portuguesa normais e com HPFH e em doentes com β -talassemia. Também foi analisado um grupo de indivíduos de origem Africana com drepanocitose.

A análise efetuada mostrou uma forte associação dos SNPs BCL11A (rs1188868 e rs766432) aos níveis de HbF ($p=7,30 \times 10^{-5}$ e $p=0,002$, respetivamente) no grupo populacional de indivíduos normais e com HPFH ($n=60$). No grupo com β -talassemia *minor* ($n=42$) foi encontrada uma forte associação do *locus* XmnI ($p=2,267 \times 10^{-6}$) aos níveis de HbF, bem como do SNP BCL11A rs766432 ($p=0,001$). Para os doentes com β -talassemia intermédia ($n=18$) e com drepanocitose ($n=16$) não foram obtidos valores significativos de associação aos níveis de HbF para qualquer um dos SNPs estudados.

Abstract

Study of polymorphisms associated with increased expression of fetal hemoglobin (HbF)

Clara Inês Antunes Pereira

Keywords: Fetal hemoglobin (HbF), Portuguese Population, Polymorphism, Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH), β -Thalassemia, Sickle-cell anemia, β -globin cluster, BCL11A, HMIP, XmnI, 3-bp deletion

Hemoglobinopathies due to mutations in the β -globin gene are responsible for monogenic diseases very common in the world, including sickle cell disease and β -thalassemia.

The form of hemoglobin present in higher concentrations in the adult (about 95%) is hemoglobin A (HbA; $\alpha_2\beta_2$); present in minimal percentages are hemoglobin A2 (HbA2; $\alpha_2\delta_2$) (2-3.5%) and fetal hemoglobin (HbF; $\alpha_2\gamma_2$) (<2%). During fetal development and the first months of life, the predominant hemoglobin is HbF. Some patients with hemoglobinopathies due to mutations in the β -globin gene, in particular patients with sickle cell anemia and β -thalassemia, have high levels of HbF. The increased synthesis of gamma globin chains also persists beyond birth in some adults with normal hematological parameters leading that the HbF levels remain high throughout life; this condition is known as hereditary persistence of HbF (HPFH).

The study of the regulation of HbF levels in red blood cells has high clinical importance. In fact, the persistence of HbF in patients with sickle cell anemia and β -thalassemia translates into a significant clinical benefit, because its presence compensates the reduction of other functional hemoglobins. Through association studies, three major *loci* were identified involved in the regulation of the gamma gene expression: the BCL11A gene on chromosome 2p16, the HBS1L-MYB intergenic region (HMIP) on chromosome 6q23, and the XmnI SNP in the promoter region of the gene HBG2 on chromosome 11p15.

The present study aimed to evaluate the association of some polymorphisms previously described in these three *loci* with HbF levels, in different populations of

individuals of Portuguese origin, namely in a normal and HPFH population group, and in patients with β -thalassemia. A group of patients of African origin with sickle cell anemia was also analyzed.

Our study showed strong associations of BCL11A SNPs (rs1188868 and rs766432) with HbF levels ($p = 7.30 \times 10^{-5}$ and $p = 0.002$, respectively) in the population group of normal and HPFH individuals ($n = 60$). In the group of patients with β -thalassemia minor ($n = 42$), strong association with HbF levels was found for the XmnI locus ($p = 2.267 \times 10^{-6}$) and for the BCL11A SNP rs766432 ($p = 0.001$). In patients with β -thalassemia intermedia ($n = 18$) and sickle cell anemia ($n = 16$) no significant associations with HbF levels were found for any of the analysed SNPs.

Abreviaturas

Hb	-Hemoglobina
HbF	-Hemoglobina fetal
HbA	-Hemoglobina adulta
HbA ₂	-Hemoglobina adulta tipo 2
HbS	-Hemoglobina S
HPFH	-Persistência hereditária de hemoglobina fetal
HGM	-Hemoglobina globular média
VGM	-Volume globular médio
CHGM	-Concentração de hemoglobina globular média
RDW	-Variação do volume de eritrócitos
HPLC	-Cromatografia líquida de alta resolução
BPG	-Bifosfoglicerato
HBB	-Gene β -globínico
HBG2	-Gene γ -globínico
LCR	-Região controlo do <i>locus</i>
SCD	-Drepanocitose/ anemia falciforme
DNA	-Ácido desoxirribonucleico
A	-Adenina
C	-Citosina
T	-Timina
G	-Guanina
PCR	-Reação em cadeia da polimerase
SSCP	-Polimorfismo conformacional de cadeia simples
SNP(s)	-Polimorfismo(s) de nucleótido único
BCL11A	-Gene BCL11A localizado no cromossoma 2q16
HMIP	-Corresponde ao <i>locus</i> HBS1L-MYB
HBS1L-MYB	-Região intergénica do cromossoma 6q23
MYB	- Proteína importante na regulação da hematopoiese
HWE	-Equilíbrio de Hardy–Weinberg

Índice

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO	IV
ABSTRACT.....	VI
ABREVIATURAS.....	VIII
ÍNDICE	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
INTRODUÇÃO	1
Introdução.....	2
Hemoglobina – Função, estrutura, variabilidade e regulação	2
Hemoglobinopatias e Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (HPFH).....	4
Diagnóstico de hemoglobinopatias	8
Estudos moleculares da regulação da expressão de HbF.....	9
Consequências funcionais dos <i>loci</i> envolvidos	12
Objetivos	13
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
Material e Métodos	16
1. Amostras	16
2. Genotipagem	17
2.1 Amplificação por Polymerase Chain Reaction (PCR).....	17
2.2 Estudo de SNPs por digestão com enzimas de restrição	20
2.3 Estudo de SNPs por SSCP	22
2.4 Estudo de SNPs por PCR em tempo real com sondas TaqMan.....	22
2.5 Sequenciação	24

3. Análise estatística	24
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
Resultados e discussão	27
1. Genotipagem	27
2. Análise estatística dos dados para os <i>loci</i> BCL11A, HMIP e HBG2 nos diferentes grupos populacionais.....	30
2.1 Grupo de indivíduos saudáveis com níveis aumentados de HbF (HPFH)	30
2.1 Grupo de doentes com β -talassemia minor	38
2.2 Grupo de doentes com β -talassemia intermédia.....	44
2.3 Grupo de doentes com drepanocitose	48
3. Estudo da deleção 3-pb no <i>locus</i> HMIP	53
4. Distribuição de frequências alélicas em diferentes populações	53
CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	62
Anexo 1.....	63
Anexo 1.A - Indivíduo normal com nível de HbF normal	63
Anexo 1.B - Indivíduo diagnosticado com β -talassemia <i>minor</i> com nível de HbF normal	64
Anexo 1.C - Indivíduo diagnosticado com drepanocitose com nível de HbF aumentada	65
Anexo 1.D - Indivíduo diagnosticado com β -talassemia intermedia com nível de HbF aumentada ..	66
Anexo 2.....	67
Protocolo de extração de DNA com o kit Favorgen	67
Anexo 3.....	68
Visualização das bandas em géis de poliacrilamida após digestão com enzimas de restrição	68
Anexo 4.....	69
Visualização das bandas na técnica de SSCP	69

Índice De Figuras

Figura 1: Estrutura da Hemoglobina A (HbA) e hemoglobina fetal (HbF).....	3
Figura 2: Troca de Hemoglobinas.....	4
Figura 3: <i>Cluster</i> para β -globina, α -globina e γ -globina.	5
Figura 4: Distribuição de drepanocitose no mundo.....	6
Figura 5: Distribuição de mutações do gene β – globínico na população global.....	7
Figura 6: <i>Loci</i> envolvidos na expressão da HbF que foram estudados em diferentes grupos populacionais.....	11
Figura 7: <i>Locus</i> para B-globina	13
Figura 8: Genótipos obtidos para o SNP rs11886868 por SSCP	27
Figura 9: Genótipos obtidos para o SNP BCL11A rs766432 por eletroforese horizontal em gel de poli-acrilamida após digestão com Accl.....	27
Figura 10: Genótipos obtidos para o SNP HMIP rs9399137 por PCR em tempo real usando sondas TaqMan.....	28
Figura 11: Genótipos obtidos para o SNP HMIP rs6934903 por eletroforese horizontal em gel de poli-acrilamida após digestão com HpyCh4III.....	28
Figura 12: Genótipos obtidos para a deleção de 3-pb por eletroforese horizontal em gel de poli-acrilamida.	28
Figura 13: Genótipos obtidos para o SNP HBG2 rs7482144 por eletroforese horizontal em gel de poli-acrilamida após digestão com XmnI	29
Figura 14: Exemplo de sequenciações	29

Figura 15: <i>Box-plots</i> mostrando a distribuição dos níveis de HbF (log-transformados) para cada genótipo de cada SNP estudado (grupo HPFH).....	31
Figura 16: Média de HbF para de indivíduos agrupados segundo o seu genótipo considerando um dos SNPs de cada <i>loci</i> (grupo HPFH)	34
Figura 17: <i>Box-plots</i> mostrando a distribuição do nível de HbF (log-transformada) para os genótipos de cada SNP (grupo β -talassémia minor).....	39
Figura 18: Média de HbF para de indivíduos agrupados segundo o seu genótipo considerando um dos SNPs de cada <i>loci</i> (grupo β -talassémia minor).	41
Figura 19: <i>Box-plots</i> mostrando a distribuição dos níveis de HbF (log-transformados) em doentes com β -talassemia intermédia para os genótipos de cada SNP	45
Figura 20: <i>Box-plots</i> mostrando a distribuição dos níveis de HbF (log-transformados) em doentes com drepanocitose para os genótipos de cada SNP	50

Índice De Tabelas

Tabela I: Frequências alélicas (em %) para os diferentes SNPs em diferentes populações de origem Europeia e Africana descritas na base de dados <i>Ensembl</i>	10
Tabela II: Meio de reação para amplificação de amostras segundo técnica de PCR.....	18
Tabela III: Meio de reação para PCR, utilizando kit multiplex	18
Tabela IV: <i>Primers</i> e temperaturas de hibridização para amplificação das diferentes sequências alvo com os polimorfismos segundo técnica de PCR	19
Tabela V: Ciclo de temperaturas do programa de PCR.....	19
Tabela VI: <i>Primers</i> e temperatura de hibridização para amplificação de sequências com e sem deleção HMIP 3-pb.....	20
Tabela VII: Enzimas de restrição e meios de reação da digestão utilizadas para os diferentes SNPs.....	21
Tabela VIII: Tamanho dos fragmentos resultantes da digestão e condições de incubação utilizadas.....	21
Tabela IX: Meio de reação utilizado para estudo do SNP rs9399137 com sondas TaqMan	23
Tabela X: Condições de execução do programa de PCR em tempo real com Sondas TaqMan.....	23
Tabela XI: Distribuição de frequências alélicas e genotípicas no grupo de indivíduos com parâmetros hematológicos normais (n=60).....	30
Tabela XII: Comparação da média dos níveis de HbF (log-transformados) entre os diferentes genótipos de cada SNP (grupo HPFH).....	32

Tabela XIII: Médias de HbF por combinação de genótipos dos polimorfismos rs11886868 rs766432 e tamanho da amostra (n) (grupo HPFH).	33
Tabela XIV: Resultados do teste de associação por regressão linear para os diferentes <i>loci</i> em estudo (grupo HPFH).	35
Tabela XV: Teste de associação segundo modelo caso/controlo, considerando o subgrupo com HbF normal (< 2%) versus subgrupo com HbF elevada (≥2%) (grupo HPFH).	36
Tabela XVI: Frequências haplotípicas para os <i>loci</i> BCL11 e HMIP, valores r^2 de desequilíbrio gamético e testes de associação aos níveis de HbF (grupo HPFH).	36
Tabela XVII: Distribuição de frequências alélicas e genotípicas no grupo de indivíduos com β -talassemia minor (n=42).	38
Tabela XVIII: Média do nível de HbF para os dois grupos de genótipos em cada SNP e comparação das médias dos níveis de HbF (log-transformados) entre os dois grupos de genótipos (grupo β -talassémia minor).	40
Tabela XIX: Resultados do teste de associação por regressão linear para os diferentes <i>loci</i> em doentes de origem portuguesa com β -talassémia minor.	42
Tabela XX: Frequências haplotípicas para os <i>loci</i> BCL11 e HMIP, valores r^2 de desequilíbrio gamético e testes de associação aos níveis de HbF (grupo β -talassémia minor).	43
Tabela XXI: Distribuição de frequências alélicas e genotípicas no grupo de indivíduos com β -talassemia intermédia (n=20) (grupo β -talassémia intermédia).	44
Tabela XXII: Média do nível de HbF nos diferentes genótipos para cada SNP e comparação das médias dos níveis de HbF (log-transformados) entre os dois grupos de genótipos (grupo β -talassémia intermédia).	46
Tabela XXIII: Resultados do teste de associação por regressão linear para os diferentes <i>loci</i> em doentes com β talassemia intermédia de origem portuguesa.	47

Tabela XXIV: Frequências haplotípicas para os <i>loci</i> BCL11 e HMIP, valores r^2 de desequilíbrio gamético e testes de associação aos níveis de HbF (grupo β -talassémia intermédia).....	47
Tabela XXV: Distribuição de frequências alélicas e genotípicas no grupo de indivíduos diagnosticados com drepanocitose (n=16).	49
Tabela XXVI: Média do nível de HbF nos diferentes genótipos para cada SNP e comparação das médias dos níveis de HbF (log-transformadas) entre os dois grupos de genótipos (grupo drepanocitose).....	51
Tabela XXVII: Resultados do teste de associação recorrendo ao modelo de regressão linear para os diferentes <i>loci</i> em indivíduos com drepanocitose.	51
Tabela XXVIII: Frequências haplotípicas para os <i>loci</i> BCL11 e HMIP, valores r^2 de desequilíbrio gamético e testes de associação aos níveis de HbF (grupo β -talassémia intermédia).....	52
Tabela XXIX: Frequências alélicas (alelo derivado) para os diferentes SNPs em diferentes populações de origem Europeia e Africana e na amostra populacional de indivíduos normais (HbF <2%) da região centro de Portugal.	54
Tabela XXX: Síntese dos resultados de associação dos diferentes polimorfismos aos níveis de HbF, para os diferentes grupos	56

Introdução

Introdução

Hemoglobina – Função, estrutura, variabilidade e regulação

A hemoglobina é uma proteína com elevado valor funcional para o equilíbrio e funcionamento do organismo humano, ao ser responsável pela ligação e transporte do oxigénio.

A hemoglobina está presente nos eritrócitos, que em condições normais apresentam um tamanho entre 6 a 9 μm e formato de discos bicôncavos. Estas células, incapazes de se reproduzirem e destinadas a sobreviver 120 dias, são renovadas a partir de hemocitoblastos por processos de maturação celular (Nelson e Cox, 2005).

Nos eritrócitos de adultos saudáveis, existem diversas formas de hemoglobinas, sendo aproximadamente 95% de hemoglobina A (HbA), 2-3,5% de hemoglobina A₂ (HbA₂) e <2% de hemoglobina fetal (HbF) (Schechter, 2008). A molécula de hemoglobina é aproximadamente esférica com um diâmetro próximo dos 5,5nm. É uma proteína tetramétrica, contendo quatro grupos prostéticos heme, cada um deles associado a uma cadeia peptídica (Nelson e Cox, 2005).

As diferentes hemoglobinas diferem nas cadeias peptídicas (Figura 1), sendo a HbA composta por duas cadeias alfa globínicas e duas cadeias beta globínicas ($\alpha_2\beta_2$), a HbA₂ composta por duas cadeias alfa e duas cadeias delta ($\alpha_2\delta_2$) e a HbF composta por duas cadeias alfa e duas cadeias gama ($\alpha_2\gamma_2$) (Schechter, 2008).

Durante o desenvolvimento fetal e primeiros meses de vida, até aproximadamente aos 6 meses, a hemoglobina que predomina é a HbF, que ao nascimento apresenta cerca de 60-90% da Hb total e vai sendo gradualmente substituída por HbA (Thein *et al.*, 2009).

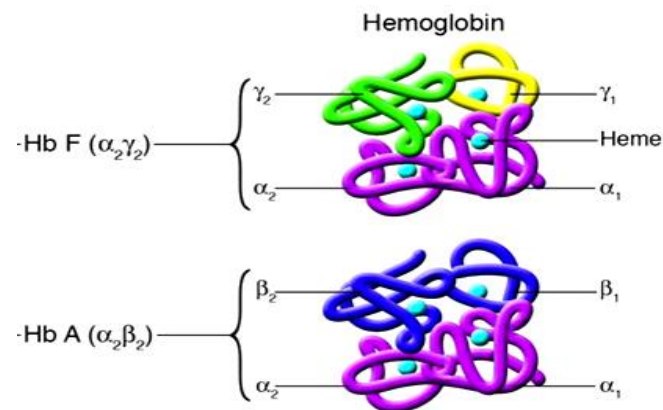


Figura 1: Estrutura da Hemoglobina A (HbA) e hemoglobina fetal (HbF). Na figura é possível visualizar a estrutura de hemoglobina fetal e hemoglobina adulta. Na hemoglobina fetal estão representadas as duas cadeias gama ($\gamma_1+\gamma_2$) e as duas cadeias alfa ($\alpha_1+\alpha_2$) com os 4 grupos heme. Na hemoglobina adulta é possível visualizar as duas cadeias alfa ($\alpha_1+\alpha_2$), e duas cadeias beta ($\beta_1+\beta_2$), também com os respectivos grupos heme (Frenette e Atweh, 2007).

Esta diferença torna-se relevante pois as duas hemoglobinas possuem um importante valor funcional, mas diferem na afinidade ao oxigênio. Na HbA a regulação da ligação ao oxigênio é feita pelo 2,3-bifosfoglicerato (BPG), sendo o BPG responsável pela diminuição da afinidade de HbA ao oxigênio (Nelson e Cox, 2005). Como o BPG não afeta a HbF, esta tem maior afinidade por oxigênio do que a HbA o que se traduz num benefício para o feto que tem de obter oxigênio proveniente do sangue materno (Nelson e Cox, 2005).

No primeiro trimestre de gestação, é sintetizada uma forma embrionária de β -globina conhecida como ϵ -globina, a partir de células primitivas de eritrócitos no saco vitelino. Nos dois últimos trimestres de gestação, a produção dos primeiros eritrócitos, começa a partir de células estaminais e progenitoras no fígado fetal. Durante esta fase ocorre uma acumulação de HbF devido a uma expressão de genes alfa (α) e gama (γ). Por altura do nascimento ocorre uma troca, e os genes gama deixam de ser expressos de forma gradual dando lugar a um aumento progressivo da expressão de genes beta. Nesta fase inicia-se a síntese de hemoglobina adulta (HbA), a partir da medula óssea, que atinge valores padrão normais por volta dos 6 meses de vida, tornando-se a hemoglobina predominante (Schechter, 2008). O local de regulação das diferentes moléculas (Figura 2), localiza-se no cromossoma 11, *cluster* β -globínico.

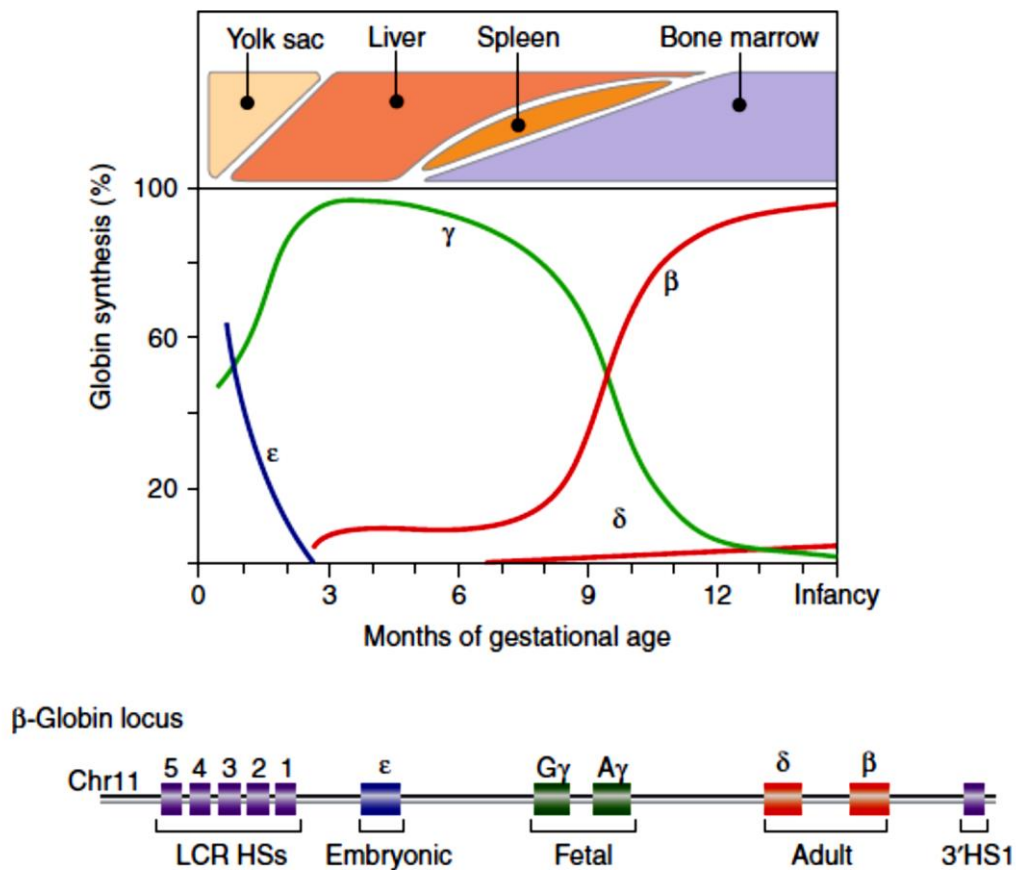


Figura 2: Troca de hemoglobinas. A imagem ilustra os níveis de cada hemoglobina (%) ao longo do desenvolvimento humano, bem como os tecidos com células precursoras de eritrócitos onde ocorre a síntese. É ainda apresentado o *cluster* β-globínico no cromossoma 11, com os respetivos genes para as cadeias gama (γ), beta (β) e delta (δ) das diferentes globinas. O LCR (região de controlo do *locus*), é responsável pela regulação do *cluster* (Sankaran e Orkin, 2012).

Hemoglobinopatias e Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (HPFH)

A diversidade de hemoglobinas e a sua concentração resultam de um processo de regulação do *locus* do gene α -globínico no cromossoma 16 e β -globínico no cromossoma 11 (Figura 3) (Schechter, 2008).

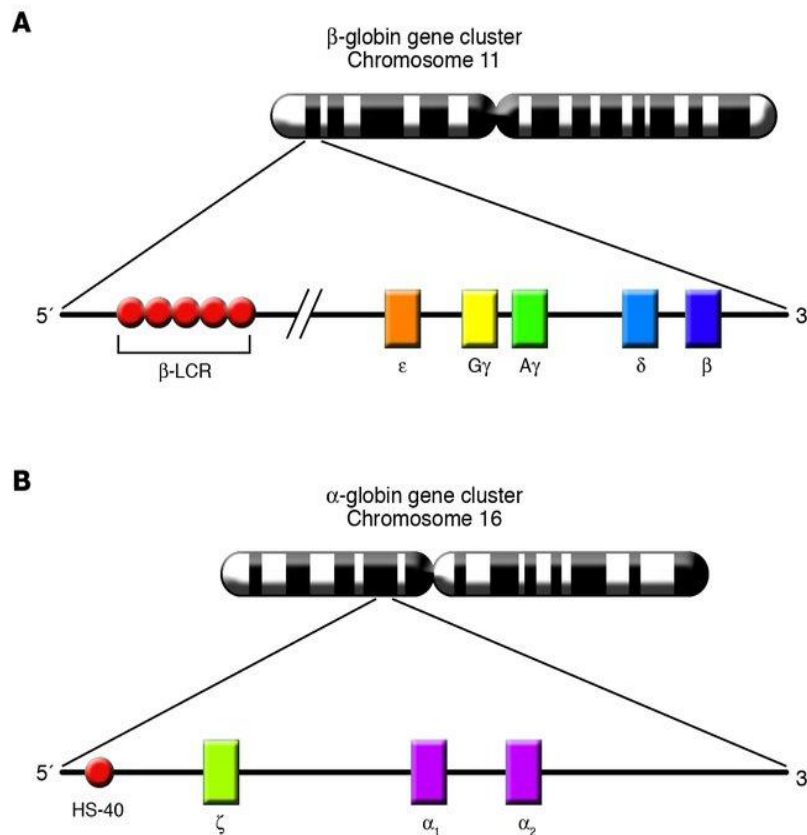


Figura 3: Cluster para β-globina, α-globina e γ-globina. (A) A figura ilustra para o cromossoma 11, o *locus* β-globínico responsável pela síntese de cadeias beta (β) HbA e cadeia gama (γ) para HbF. **(B)** No cromossoma 16, podemos visualizar o *locus* α-globínico, crucial para a síntese de todas as hemoglobinas (Frenette e Atweh, 2007).

Os distúrbios nas hemoglobinas por mutações no gene β-globínico (HBB), drepanocitose e β-talassemia, são das maiores causas de mortalidade no mundo por doenças hereditárias (Sankaran e Orkin, 2012).

A drepanocitose (anemia falciforme) resulta da homozigotia para uma mutação no gene β-globínico por troca de um único nucleótido (c.20A>T). Esta mutação leva à substituição de valina por ácido glutâmico no resíduo sete da globina (p.Glu7Val) e as cadeias sintetizadas vão, juntamente com as cadeias α globínicas, formar HbS (α₂β^S₂). A presença de HbS em homozigotia provoca deformação dos eritrócitos (Sankaran e Orkin, 2012; Schechter, 2008). A prevalência de indivíduos afetados por esta hemoglobinopatia é muito comum na África subsariana (Figura 4), estando estimado que surjam todos os anos 230 000 novos casos em África, 2600 casos na América do Norte e 1300 na Europa (Rees, Williams e Gladwin, 2010).

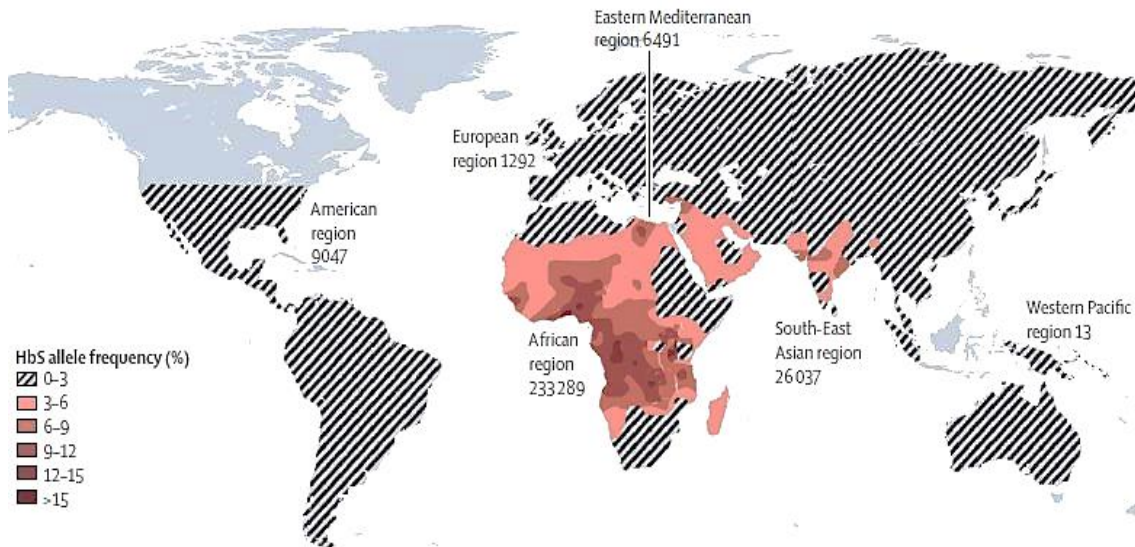


Figura 4: Distribuição de drepanocitose no mundo (Rees, Williams e Gladwin, 2010).

Na β -talassemia, a produção insuficiente de cadeias de globina β , resulta num excesso de cadeias α livres nos eritroblastos, prejudicando a maturação e resultando consequentemente numa produção deficiente de eritrócitos (Sankaran e Orkin, 2012). Quando a síntese de cadeias gama globínicas está também aumentada, as cadeias α em excesso são utilizadas na síntese de HbF.

As β -talassemias podem apresentar fenótipos clínicos variados, dependendo das mutações no gene β -globínico, bem como de mutações que apesar de não estarem localizadas neste gene, exercem influência sobre a síntese de globina β . Deste modo, as β -talassemias podem apresentar fenótipos (sintomas clínicos) muito variados, dependendo da severidade das mutações envolvidas (Weatherall, 2001).

Estão descritas mais de 200 mutações no gene β -globínico, em doentes diagnosticados com β -talassemia. A maioria destas mutações deve-se a trocas de um único nucleótido ou perda de uma ou duas bases nucleotídicas (Weatherall, 2001). As diferentes mutações no gene β -globínico estão associadas a fenótipos β^+ (expressão reduzida do gene) e β^0 (ausência total de expressão do gene), que quando em homozigotia ou heterozigotia composta originam diferentes tipos de β -talassemia. Os diferentes fenótipos refletem o efeito destas mutações. Nos indivíduos homozigóticos β^0/β^0 , onde há ausência total de síntese de cadeias β , o fenótipo é dos mais severos, sendo vulgarmente designada por β -talassemia *major*. Em indivíduos heterozigóticos β^+/β^0 ou β^+/β^+ , ocorre uma diminuição significativa da síntese de cadeias β , mas o fenótipo não é tão severo, dependendo do tipo de mutação β^+ , uma vez que estes

indivíduos ainda são capazes de sintetizar algumas cadeias globínicas β . Esta talassémia é designada β -talassemia intermédia. Os indivíduos heterozigóticos ou heterozigóticos compostos β^+/β^N ou β^0/β^N não são doentes ou têm talassemia *minor* (Weatherall, 2001).

A ocorrência dos vários tipos de β -talassemias no mundo, em consequência das mutações, não é uniforme (Figura 5). Em Portugal existe uma prevalência da mutação c.92+6T>C (anterior designação: IVS1-6 T>C (β^+), estando ainda descritas outras mutações (β^0), nomeadamente c.118C>T (p.Glu40Term) (anterior designação: CD39 CAG>TAG), c.92+1G>A (anterior designação: IVS1-1 G>A) e c.92+110G>A (anterior designação: IVS1-110 G-A), c.48 G>A (p.Trp16Term) (anterior designação: CD15 TGG>TGA) (Tamagnini *et al.*, 1993).

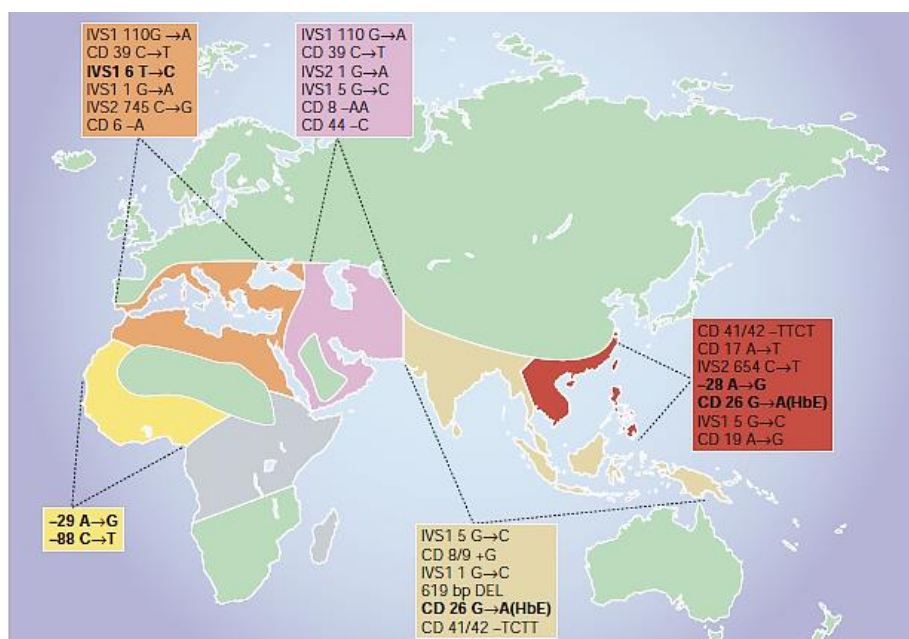


Figura 5: Distribuição de mutações do gene β – globínico na população global (Weatherall, 2001).

Em alguns casos, a síntese de cadeias globínicas gama persiste em adultos sem hemoglobinopatias, com parâmetros hematológicos normais, e a concentração de hemoglobina fetal permanece com valores elevados durante toda a vida. Esta condição é conhecida como persistência hereditária de hemoglobina fetal (HPFH, na sigla Inglesa). Estes casos resultam de variações polimórficas localizadas ao longo do *cluster* β -globínico ou em intrões dos genes gama, responsáveis pela síntese de cadeias γ que compõem HbF (Thein *et al.*, 2009).

Estudos em indivíduos saudáveis e em indivíduos com β -talassemia e drepanocitose sugerem que o aumento dos níveis de HbF e de células F, parece estar ligada ao *cluster* β -globínico, tendo sido encontrados polimorfismos na região de controlo (LCR), na região promotora do gene β e no segundo intrão (IVS2) dos genes gama associados ao aumento de HbF (Jouini *et al.*, 2011).

Observações clínicas de doentes com hemoglobinopatias demonstram que os doentes com níveis de HbF aumentada apresentam menor severidade. Este facto remete para possíveis descobertas terapêuticas no tratamento de hemoglobinopatias, através de um aumento nos níveis de HbF (Sankaran e Orkin, 2012).

Neste sentido, a compreensão do processo de troca de HbF por hemoglobina adulta, e o silenciamento de HbF tornaram-se uma área de grande interesse para os hematologistas, com a perspectiva de controlar a indução clínica da produção HbF. Através desta manipulação seria possível diminuir a severidade de diversas hemoglobinopatias.

Diagnóstico de hemoglobinopatias

O diagnóstico das hemoglobinopatias deve ser estabelecido antes de se proceder ao tratamento, uma vez que pode ter origens diversas (Mehta e Hoffbrand, 2009).

Um dos exames de despistagem comuns é o hemograma, que realiza a contagem de valores de hemoglobina (Hb) e calcula diversos índices hematológicos como o volume de eritrócitos (hematócrito), o volume globular médio (VGM), a hemoglobina globular média (HGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM), variação do volume de eritrócitos (RDW) (Mehta e Hoffbrand, 2009). Um grande número de hemoglobinopatias traduz-se em alterações nos níveis dos vários tipos de hemoglobinas no sangue periférico e a sua identificação e quantificação pode ser realizado por HPLC (cromatografia líquida de alta resolução) (Anexo 1) (Nelson e Cox, 2005; Mehta e Hoffbrand, 2009). Assim, os indivíduos heterozigóticos β^+/β^N ou β^0/β^N , com uma anemia ligeira, hipocrómica e microcítica, mostram no HPLC valores HbA2 elevada (>3,5%) sendo diagnosticados com β -talassemia *minor* (Anexo 1.B). Quando os dois genes estão mutados, os indivíduos heterozigóticos ou heterozigóticos compostos β^+/β^0 ou β^+/β^+ , apresentam uma anemia moderada hipocrómica e microcítica, com Hb A2 e HbF

elevadas no HPLC - β -talassemia intermédia (Anexo 1.D). Na drepanocitose, os indivíduos homozigóticos SS têm uma anemia hemolítica moderada, com reticulocitose e células falciformes no esfregaço de sangue periférico e mostram no HPLC um pico intenso para as bandas de HbS, ausência de HbA e HbF com níveis variados (Anexo 1.C).

Nos últimos anos a genética molecular tem vindo a estabelecer uma forte posição no diagnóstico e compreensão de doenças genéticas, nomeadamente as hemoglobinopatias, numa tentativa de estabelecer a correlação entre os fenótipos patológicos e as lesões no genoma.

Estudos moleculares da regulação da expressão de HbF

Como referido anteriormente, indivíduos com alguns tipos de anemia, podem apresentar um aumento do nível de HbF. O mecanismo de regulação que leva a este aumento de HbF não está ainda bem definido, mas supõe-se que envolva o *cluster* β -globínico (Figura 3). Quando o gene responsável pela síntese de cadeias β está inativo ou mutado, ocorre o aumento da expressão de γ -globinas, e conseqüentemente o aumento dos níveis de HbF (Thein *et al.*, 2009).

O estudo dos níveis de HbF tem uma importância acentuada, pois a análise dos níveis da hemoglobina é útil como indicador de possíveis hemoglobinopatias, mas também pode ter benefício clínico em alguns doentes, pois o seu aumento compensa a redução de outras hemoglobinas funcionais (Thein *et al.*, 2009). Em alguns indivíduos com anemia severa é administrada hidroxiureia para elevar os níveis de HbF (Green e Barral, 2011).

É perceptível em diversas análises efetuadas, que o aumento do nível de HbF varia muito entre indivíduos (Thein *et al.*, 2009). Esta variação é regulada a nível genético, estando dependente de mutações que envolvem diversos genes (Lettre *et al.*, 2008). Através de estudos de associação foram identificados três *loci* principais envolvidos no aumento dos níveis de HbF (Figura 6):

1. O polimorfismo C/T (SNP rs7482144) (Xmn1-HBG2) localizado na região 5' promotora do gene HBG2 do cromossoma 11p15 (Gilman e Huisman 1985).

2. Diversos polimorfismos localizados na região intergênica HBS1L-MYB (HMIP) do cromossoma 6q23, nomeadamente os SNPs rs9399137, rs4895441, rs9402686 e rs6934903 (Thein *et al.*, 2007). Recentemente, foi identificada uma deleção de 3-pb, associada ao aumento de HbF, em desequilíbrio completo (LD) com SNP rs9399137 (Farrel *et al.*, 2011).

3. Diversos polimorfismos localizados no gene BCL11A (SNPs rs766432, rs11886868 e rs4671393) localizado no cromossoma 2p16 (Menzel *et al.*, 2007).

Estes estudos foram realizados em diversos grupos populacionais, nomeadamente doentes com drepanocitose de descendência africana, doentes com β -talassemia e indivíduos saudáveis com HPFH, tendo-se verificado que os três principais *loci* BCL11A, HMIP e Xmn1-HBG2, são responsáveis por cerca de 20-50% da variação dos níveis de HbF (Thein, *et al.*, 2009; Sankaran *et al.*, 2008).

Estes polimorfismos têm vindo a ser estudados em diversos grupos populacionais estando descritas frequências alélicas, nomeadamente na base de dados *Ensembl genome database project* (Tabela 1).

Tabela 1: Frequências alélicas (em %) para os diferentes SNPs em diferentes populações de origem Europeia e Africana descritas na base de dados *Ensembl*.

Gene	SNP	Alelo	N/W EUR (CEU)	Espanha (IBS)	AFR Am (ASW)
BCL11A	rs1188868	C	30	18	28
		T	70	82	72
	rs766432	C	16	11	25
		A	84	89	75
HMIP	rs9399137	C	22	25	9
		T	78	75	91
	rs6934903	A	12	7	7
		T	88	93	93
HBG2	rs7482144	T	26	36	6
		C	74	64	94

N/W EUR (CEU): Indivíduos de origem Europeia (Norte/Oeste) (*Ensembl*).

IBS: subpopulação Ibérica (*Ensembl*).

AFR (ASW): População Afro-americana residente no sudoeste dos EUA (*Ensembl*)

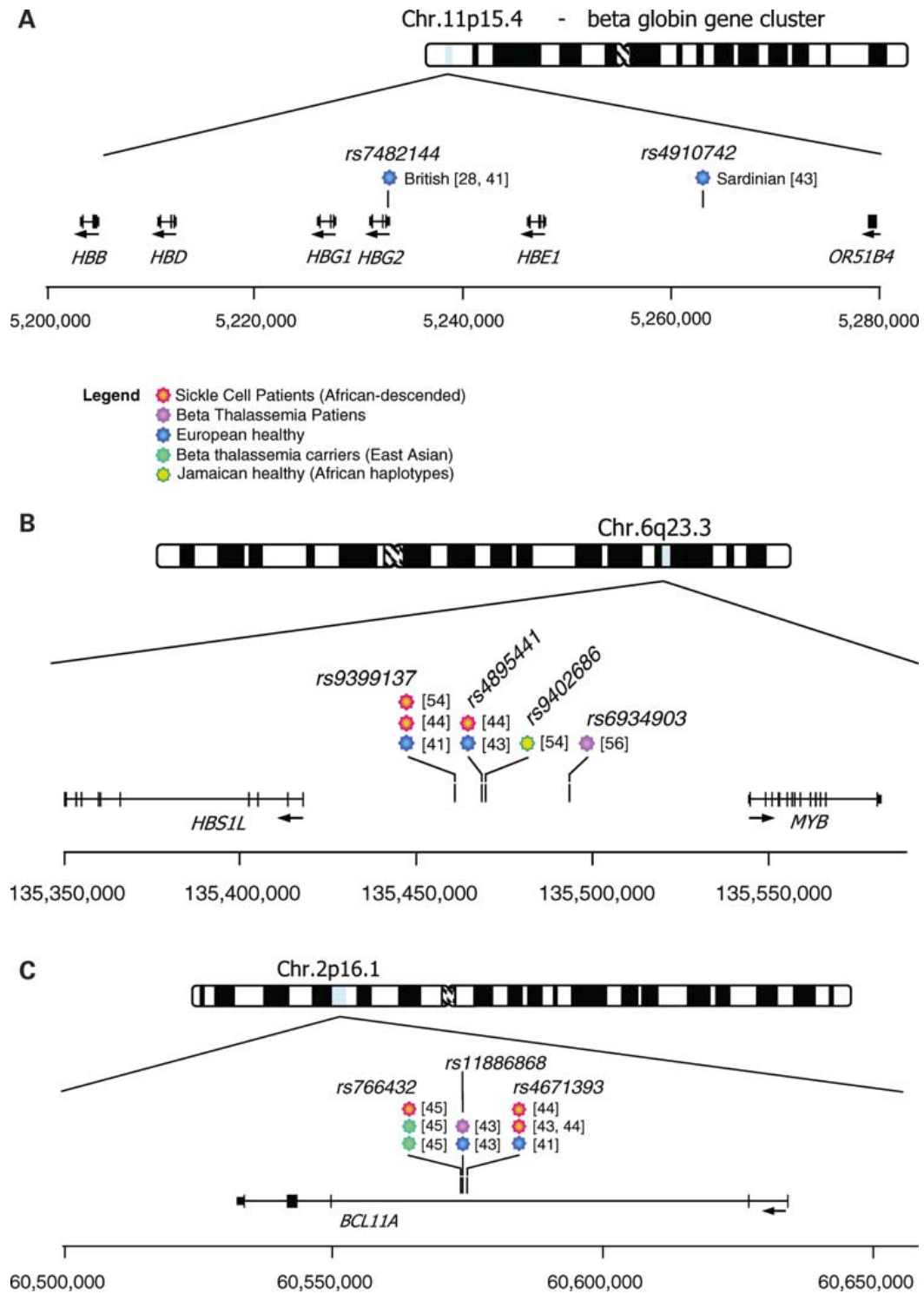


Figura 6: Loci envolvidos na expressão da HbF que foram estudados em diferentes grupos populacionais. A figura mostra diferentes SNPs nos loci HBG2 (A), HMIPI (B) e BCL11A (C), encontrados associados à HbF em diferentes grupos de populações (assinaladas a cores diferentes) (Thein *et al.*, 2009).

Consequências funcionais dos *loci* envolvidos

Outros trabalhos realizados permitiram identificar consequências funcionais envolvidas na regulação da expressão de HbF para os diferentes *loci* mencionados. Assim, para o *locus* Xmn1-HBG2 tem sido sugerido que existe um efeito direto na expressão do gene HBG2, com consequências no aumento da expressão de γ -globina, uma vez que o alelo está localizado no promotor do gene HBG2 (Thein *et al.*, 2009). Todavia, outros estudos mostram que existem outros *loci* funcionais na região 5'HS4 LCR do *cluster* β -globínico em desequilíbrio de ligação com o SNP XmnI (Neishabury *et al.*, 2012).

Estudos recentes demonstram que a região intergênica (HMIP) contém elementos reguladores que controlam a expressão do gene MYB (Figura 7), que influencia a diferenciação de eritrócitos, e indiretamente os níveis de HbF. Uma diminuição na expressão de MYB contribui para o aumento dos níveis em HbF e células F (Thein *et al.*, 2009 e Green e Barral, 2011). Pensa-se que quando o gene MYB é menos expresso, a eritropoiese, processo de diferenciação celular, ocorre mais rapidamente, o que origina que a expressão de HbF seja mais acentuada. A expressão de γ -globina ocorre nas células F, sintetizadas em maior número quando a diferenciação celular é muito rápida; assim com o aumento de células F, ocorre um aumento de HbF (Thein *et al.*, 2009).

O *locus* BCL11A é responsável por cerca de 15% da variabilidade de células F na população Europeia. Diversos estudos demonstram que a expressão de BCL11A inibe a expressão de γ -globina, levando à diminuição de níveis de HbF (Thein, *et al.*, 2009 e Green e Barral, 2011) (Figura 7). Estudos recentes sugerem que no intrão 2 do gene BCL11A, onde se encontram localizados alguns dos SNPs associados aos níveis de HbF, contem uma região intensificadora específica de células eritróides (Banan, 2013). O polimorfismo rs4671393 é o que se encontra mais associado à expressão de HbF em doentes com SCD (Lettre *et al.*, 2008).

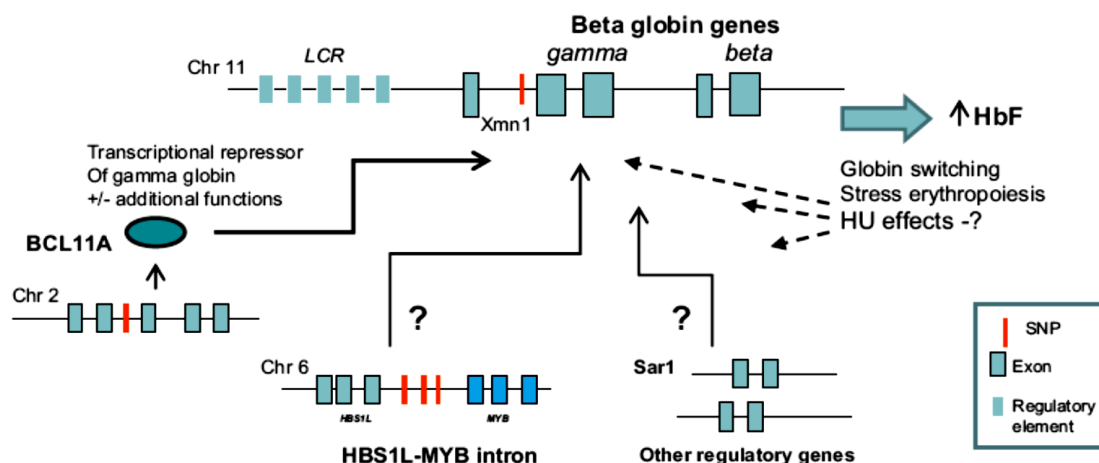


Figura 7: Locus para B-globina. Tentativa de representação de interação dos diferentes *loci* responsáveis pelo aumento do nível de HbF (Green e Barral 2011).

Objetivos

Uma vez reconhecido o benefício clínico, do aumento de hemoglobina fetal, em indivíduos que apresentam um quadro clínico patológico severo para diferentes hemoglobinopatias, têm sido realizadas inúmeras pesquisas com o objetivo de compreender o processo de regulação e síntese de HbF. Um dos contributos científicos relevantes é o estudo molecular dos diferentes polimorfismos associados ao aumento de hemoglobina fetal, com o intuito de contribuir para no futuro, encontrar meios de controlo da indução de hemoglobina fetal.

Com o presente trabalho pretende-se avaliar a associação de alguns dos diferentes polimorfismos previamente descritos localizados nos *loci* BCL11A, (polimorfismos rs11886868 e rs766432), região intergénica HBS1L-MYB, (polimorfismos rs9399137 e rs6934903) e HBG2 (polimorfismo Xmn1_rs7482144), à expressão de HbF em diferentes grupos de indivíduos de naturalidade portuguesa, nomeadamente indivíduos normais sem e com níveis aumentados de HbF (HPFH), doentes com β -talassemia *minor* e doentes com β -talassemia intermédia. Foi também analisado um grupo de doentes com drepanocitose de origem Africana.

Neste sentido, foram definidos os seguintes objetivos específicos para o presente trabalho:

1. Estimar frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas para cada um dos SNPs em análise, nos diferentes grupos de indivíduos;
2. Avaliar a associação dos diversos polimorfismos nos *loci* BCL11A, HMIP e HBG2 aos níveis de HbF, através de análises estatísticas;
3. Comparar os resultados obtidos no presente trabalho com os obtidos e publicados em diferentes populações para os mesmos polimorfismos.

Material e Métodos

Material e Métodos

1. Amostras

O presente trabalho foi realizado com amostras de indivíduos não aparentados, saudáveis e com hemoglobinopatias, disponibilizadas pelo Departamento de Hematologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), num total de 136 amostras.

Foram considerados quatro grupos de indivíduos para a análise estatística da associação aos níveis de HbF dos polimorfismos estudados nos *loci* BCL11A, HMIP e HbG2:

i) Um grupo de 60 indivíduos saudáveis, com parâmetros hematológicos normais, com níveis de HbF entre 0,1% e 7,4%, e idades compreendidas entre 2 e 75 anos. Quinze indivíduos mostram níveis aumentados de HbF (média =3,85%; variação: 2% a 7,4%) sendo classificados como formas comuns de Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (HPFH).

ii) Um grupo de 42 indivíduos, diagnosticados com β -talassemia menor, com níveis de HbF entre 0,2% e 9,5%, e idades compreendidas entre os 2 e os 77 anos. Todos estes doentes mostram níveis de HbA2 aumentada (média 4,8%; variação: 3,9%-6,8%). O estudo molecular realizado em 23 indivíduos revelou heterozigotia para uma das seguintes mutações β -globínicas: c.118C>T (p.Glu40term); c.48G>A (p.Trp16term); c.92+6T>C; c.126_129 delCTTT; c.92+1G>A.

iii) Um grupo de 18 doentes diagnosticados com β -talassemia intermédia, com níveis de HbF entre 4,6% e 50%, e idades compreendidas entre 22 e 62 anos. Na análise estatística, foram considerados valores de HbF, sem administração de hidroxiureia, em 9 doentes correntemente submetidos a este tratamento. Catorze doentes são homozigóticos para a mutação c.92+6T>C no gene β -globínico, um é homozigótico para a mutação -90C>T, dois são heterozigóticos compostos para uma alteração molecular no gene β -globínico (c.92+1G>A e c.48G>A) e uma triplicação do gene alfa-globínico (triplicação α), e um é heterozigótico para uma mutação de transmissão dominante c.404_413 del TGGCTGGTGT ins GCAG.

iv) Um grupo de 16 doentes de origem Africana com drepanocitose, idades compreendidas entre 8 e 50 anos, e níveis de HbF que variam entre 0,6% e 23,5%. Treze doentes são homozigóticos HbSS (homozigotia c.20A>T; p.Glu7Val) e três são heterozigóticos compostos para HbS e mutações no gene β -globínico (HbD p.Glu122Gln, c.92+6T>C e p.Glu40Term).

Esta investigação foi realizada de acordo com a Lei nº 12/2005 de 26 de Janeiro, nomeadamente após obtenção do consentimento informado dos doentes para realização de estudos genéticos.

2. Genotipagem

A genotipagem dos SNPs nas amostras de DNA genómico foi realizada no laboratório de Genética do Centro de Investigação em Antropologia e Saúde (CIAS), com exceção da eletroforese capilar de sequenciação efetuada no laboratório de Hematologia do Hospital Pediátrico de Coimbra num sequenciador automático. Para algumas das amostras o DNA genómico foi previamente extraído a partir de sangue periférico no laboratório de Hematologia Molecular do Hospital Pediátrico no decorrer dos estudos moleculares de diagnóstico aí realizados. Para outras amostras procedemos à extração do DNA genómico a partir de sangue periférico utilizando o *FavorPrep™ Genomic DNA Mini Kit* (Favorgen Biotech Corp., Taiwan), de acordo com as recomendações do fabricante (ver Anexo 2).

2.1 Amplificação por *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Foi utilizada a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para amplificação das regiões genómicas onde se localizam os diferentes polimorfismos. O protocolo de PCR utilizado para amplificação das amostras de DNA para os vários polimorfismos encontra-se descrito na Tabela II.

Tabela II: Meio de reação para amplificação de amostras segundo técnica de PCR

Reagentes	Volume por amostra (μ l)
Água bi-destilada	16,5
Tampão 10x	2,5
MgCl ₂ (25mM)	3
dNTPs (10 mM cada)	0,5
<i>Primer</i> direto (100 ng/ μ l)	0,5
<i>Primer</i> reverso (100 ng/ μ l)	0,5
Taq Pol (5 U/ μ l)	0,1
DNA	1,5

A amplificação das amostras de DNA para o estudo da deleção HMIP 3-pb foi realizada recorrendo ao kit *Multiplex PCR* (Qiagen, CA, USA) (Tabela III).

Tabela III: Meio de reação para PCR, utilizando kit multiplex

Reagentes	Volume por amostra (μ l)
Água bi-destilada	2
Mix	5
Solução Q	1
<i>Primer</i> direto (100 ng/ μ l)	0,5
<i>Primer</i> reverso (100 ng/ μ l)	0,5
DNA	1,5

Os *primers* utilizados na amplificação das regiões genómicas dos vários polimorfismos encontram-se descritos na Tabela IV. A sequência dos *primers* para estudo dos SNPs rs11886868, rs766432 e rs6934903 foi obtida recorrendo ao programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (Rozen e Skaletsky, 2000) e para o SNP XmnI-rs7482144 em (Sutton *et al.*, 1989).

Tabela IV: Primers e temperaturas de hibridização para amplificação das diferentes sequências alvo com os polimorfismos segundo técnica de PCR

Cr	Gene	SNP	Primers	Temperatura de hibridização
2	BCL11A	rs11886868	Dir: 5'-ACGCCCTATGGTGAATACA-3' Rev: 5'-CCTAACCTCTGACCCCTTC-3'	58°C
		rs766432	Dir: 5'-GAAGGGGATTGACAGCAAAG-3' Rev: 5'-CCAGTGGTGGGTGTTTTGTT-3'	58°C
6	HMIP	rs6934903	Dir: 5'-TGGCCATCTCTGATTAGTTGAA-3' Rev: 5'-TATGACTCCTTGGCCACAT-3'	60°C
11	HBG2	rs7482144	Dir: 5'-AACTGTTGCTTTATAGGATTTTT-3' Rev: 5'-AGGAGCTTATTGATAACCTCAGAC-3'	58°C

As amplificações foram realizadas num termociclador TProfessional (Biometra) com o seguinte programa (Tabela V): desnaturação inicial durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 45 segundos, ligação dos *primers* (à temperatura indicada na Tabela III) durante 45 segundos e extensão da cadeia de DNA a 72°C durante 1 minuto. Foi efetuado uma extensão final a 72°C durante 10 minutos. O produto de PCR (5µl de amostra) foi depois visualizado à luz ultravioleta após eletroforese em gel de agarose 1,5% com Brometo de Etídio (concentração final 0,5µg/mL), para confirmar o sucesso da amplificação. Em cada uma das amplificações realizadas, foi usado um controlo negativo de modo a excluir possíveis contaminações.

Tabela V: Ciclo de temperaturas do programa de PCR

Fase	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação Inicial	94	3min	1x
Desnaturação	94	45seg	35x
Hibridização	58°C/60°C	45seg	
Extensão	72	1min	
Extensão final	72	7min	1x
Manutenção	4	∞	

O polimorfismo Inserção/deleção (ins/del) HMIP 3-pb foi estudado mediante a utilização de dois conjuntos de *primers* descritos em Farrel *et al.* (2011): um conjunto que deteta o fragmento sem a deleção e outro que amplifica o fragmento com a deleção

(Tabela VI). O programa de PCR utilizado foi o descrito na Tabela III com 58°C como temperatura de *annealing* dos *primers*.

Tabela VI: *Primers* e temperatura de hibridização para amplificação de sequências com e sem deleção HMIP 3-pb

Cr	<i>Primers</i>	Sequência
6	5'-TCACTCTGGACAGCAGATGTTACTAT-3'	Fragmento sem
	5'- CTCAGTGATGGTATTTCTGGAGAC-3'	deleção (207 pb)
	5'- AGCCCGTCCAGACACTCATTGTT-3'	Fragmento com
	5'-CCCTGATAACATTTTGTGGTTTTTCATTTAACAT-3'	deleção (276 pb)

O produto de PCR para a ins/del HMIP 3-pb foi analisado em géis de poliacrilamida 8%, o que permitiu discriminar de imediato os diferentes genótipos. Foi utilizado o sistema de tampões descrito por Luís e Caeiro (1995): tampão do gel 0,375 M Tris/HCl (pH 8,8) e tampão das pontes 0,125 M Tris/Glicina (pH 8,8). Foi aplicado um volume de 2µl de produto de PCR, e a eletroforese realizada durante aproximadamente 2 horas a 100V. A visualização das bandas foi efetuada por coloração com nitrato de prata de acordo com (Budowle *et al.*, 1991) (ver Anexo 3).

2.2 Estudo de SNPs por digestão com enzimas de restrição

A ocorrência de uma mutação pode originar a alteração de um local de restrição, que pode ser utilizada para a discriminação alélica. O produto de amplificação digerido com enzimas de restrição origina diferentes fragmentos em função do alelo presente na amostra, que separados na eletroforese de acordo com o seu tamanho, permitem distinguir os diferentes genótipos. Esta técnica é correntemente chamada de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

A genotipagem das amostras para os SNPs rs766432, rs6934903, rs7482144 e rs3817621 foi realizada por RFLP com as enzimas de restrição e condições descritas na Tabela VII.

Tabela VII: Enzimas de restrição e meios de reação da digestão utilizadas para os diferentes SNPs

Reagentes	Enzima de Restrição			
	Accl (rs766432)	HpyCh4III (rs6934903)	Xmnl (rs7482144)	Acil (rs3817621)
Volume por amostra (µl)				
Água	3,7	3,7	3,6	3,9
Tampão 10x	0,5	0,5	0,5	0,5
Enzima	0,5 (5U)	0,3 (1,5U)	0,5 (5U)	0,2 (1U)
BSA	-	0,1	0,1	0,1
DNA	0,3	0,3	0,3	0,3
Volume total	5	5	5	5

O tamanho dos fragmentos resultantes da digestão para cada um dos SNPs encontram-se discriminados na Tabela VIII, bem como a temperatura e tempo de incubação utilizados.

Tabela VIII: Tamanho dos fragmentos resultantes da digestão e condições de incubação utilizadas.

SNP	Enzima	Fragmentos (pb)	Temperatura	Tempo
rs766432	Accl	Alelo A: 110 + 93 Alelo C: 93 + 64 + 46 Produto PCR: 203	37°C	16h
rs6934903	HpyCh4III	Alelo T: 124 + 40 Alelo A: 77 + 47 + 40 Produto PCR: 164	37°C	16h
rs7482144	Xmnl	Alelo T: 207 + 450 Alelo C: 657 Produto PCR: 657	37°C	16h
rs3817621	Acil	Alelo G: 76+103+3+65 Alelo C: 179+3+65 Produto PCR: 247	37°C	16h

Após a digestão os fragmentos foram separados em géis horizontais de poliacrilamida a concentrações de 10% para os SNPs rs766432 e rs6934903 e de 6% para o rs7482144. Foi utilizado o sistema de tampões descrito por Luís e Caeiro (1995): tampão do gel 0,375 M Tris/HCl (pH 8,8) e tampão das pontes 0,125 M Tris/Glicina (pH 8,8). Foi aplicado um volume de 2µl de produto digerido e a eletroforese foi realizada durante aproximadamente 2 horas a 100V. A visualização das bandas foi efetuada por coloração com nitrato de prata de acordo com (Budowle *et al.*, 1991) (ver Anexo 3).

2.3 Estudo de SNPs por SSCP

Para genotipagem das amostras para o SNP rs11886868, utilizou-se a técnica de SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*). A detecção de SNPs por SSCP (polimorfismos conformacionais do DNA em cadeia simples), baseia-se nas diferenças de conformação que os segmentos de DNA em cadeia simples adquirem, após desnaturação dos produtos de PCR. Estas diferenças de conformação devem-se a substituição de apenas uma ou algumas bases. Os diferentes polimorfismos podem ser detetados em eletroforese de gel de poliacrilamida, uma vez que as diferentes conformações sofrem diferentes migrações no gel. A discriminação dos alelos é feita por comparação dos diferentes perfis de eletroforese após coloração por nitrato de prata.

Aos produtos da amplificação para o SNP rs11886868 adicionou-se uma solução desnaturante que incluiu 95% formamida desionizada; 0,1% azul de bromofenol; 0,1% xileno-cianol; 10 mM EDTA; 0,1% SDS, na proporção de 1:1 (volume total de 6µl). A mistura foi desnaturada por acção do calor (94°C durante 5min) e imediatamente colocada em gelo o que impede que as cadeias desnaturadas voltem a emparelhar. Os produtos de PCR desnaturados foram aplicados num mini-gel (7,2x10,2cm) vertical de poliacrilamida não-desnaturante: 10% de acrilamida-bisacrilamida (C=2,5%), 10% de glicerol e 200mM de tampão TBE (89mM Tris; 89mM ácido bórico; 2mM EDTA; pH8,3), e submetidos a eletroforese a 60V durante 16 horas. O resultado foi observado após coloração dos fragmentos de DNA com nitrato de prata de acordo com Bloom *et al.* (1987) (ver Anexo 4).

2.4 Estudo de SNPs por PCR em tempo real com sondas TaqMan

O polimorfismo rs9399137, da região intergénica HMIP, foi genotipado por PCR em tempo real recorrendo a Sondas TaqMan (Assay ID C__30488126_20) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As sondas TaqMan apresentam numa das extremidades um fluoróforo (repórter), e na outra um *quencher* que inibe a fluorescência do repórter. Os produtos da reacção de PCR são detetados após degradação da sonda pela acção da Taq Polimerase, que separa o *quencher* do repórter permitindo a emissão de fluorescência. Durante o

processo de PCR em tempo real é amplificada a região alvo que contem o SNP em estudo e são utilizadas duas sondas marcadas com fluorocromos diferentes (FAM e VIC) específicas para cada um dos alelos do SNP. Cada uma das duas sondas TaqMan hibridiza especificamente com a sequência complementar (alelo específico) na cadeia simples de DNA e no processo de amplificação a sonda TaqMan ligada à sequência de DNA complementar é degradada pela atividade da Taq polimerase o que permite a emissão de fluorescência. Assim, durante o processo de amplificação a emissão de luz aumenta de forma exponencial (Novais e Pires-Alves 2004).

O meio de reação de PCR em tempo real utilizado no estudo do polimorfismo HMIP rs9399137 encontra-se discriminado na Tabela IX e as condições do programa de amplificação são descritas na Tabela X. A reação de amplificação decorreu num termociclador *MiniOpticon™ Real-Time PCR Detection System* (BioRad Laboratories, CA, USA).

Tabela IX: Meio de reação utilizado para estudo do SNP rs9399137 com sondas TaqMan

Reagentes	Volume por amostra (µl)
Água	12
Mix	5
Sonda (20x)	0,5
DNA	2,5
Vol total	20

Mix: *SsoFast™ Probes Supermix* (BioRad)

Tabela X: Condições de execução do programa de PCR em tempo real com Sondas TaqMan

Fase	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação Inicial	95°C	15 min	1
Desnaturação	92°C	15 seg	40
Hibridização/Extensão	64°C	1 min	

2.5 Sequenciação

No sentido de assegurar a fiabilidade da genotipagem com as diversas técnicas enunciadas, cerca de 10% das amostras com os diferentes genótipos de cada um dos SNPs foram sequenciadas recorrendo ao método de Sanger (Sanger *et al.* 1977). Os produtos amplificados foram purificados com a exonuclease ExoSap-IT (USB, Cleveland, OH, USA) (2 μ L de produto de PCR + 0,5 μ L de ExoSap-IT, a 37°C durante 15 minutos, ao fim dos quais a reacção foi parada a 80°C durante 15 min) e utilizados diretamente na reacção de sequenciação utilizando o *kit BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para cada amostra foi preparada uma solução contendo 2 μ L de produto de PCR após purificação com a enzima ExoSap-IT, 1 μ L de solução BigDye, 0,5 μ L de primer (direto ou reverso, 100 ng/ μ L) em 6,5 μ L de H₂O. O volume final de 10 μ L foi colocado num termociclador e a reacção de sequenciação decorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C durante 5 minutos seguida de 25 ciclos de desnaturação a 96°C durante 20 segundos e *annealing* dos *primers* e extensão a 60°C durante 2 minutos. Os produtos sequenciados foram purificados em colunas DyeEx 2.0 (Qiagen, CA, USA) e aplicados no sequenciador ABI_3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3. Análise estatística

Os resultados obtidos na genotipagem dos vários SNPs, foram submetidos a análise estatística com o objetivo principal de avaliar se os diferentes polimorfismos influenciam os níveis de HbF em cada um dos grupos considerados.

A análise estatística dos dados incluiu:

- Exploração de dados para avaliar se a variável dependente em análise (níveis de HbF) apresenta distribuição normal nos grupos em estudo (testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk) e se as variâncias populacionais são homogéneas (ao teste de Levene). Tendo em vista normalizar ou aproximar da normalização a variável dependente e tornar homogéneas as variâncias populacionais relativamente aos níveis de HbF nos diferentes grupos populacionais em estudo optou-se por fazer a transformação logarítmica de base 10 (LG10) dos níveis de HbF para cada amostra. A transformação logarítmica dos níveis de HbF normalizou (ou aproximou da

normalização) a distribuição da variável dependente, com as variâncias populacionais a registarem valores não significativos.

- Estatística descritiva, para obtenção de frequências genóticas, alélicas e haplotípicas, bem como valores p do equilíbrio de Hardy-Weinberg e elaboração de gráficos *box-plot* ou de médias, ilustrativos dos níveis de HbF.

- Testes ANOVA e T-Student, para comparação de médias de HbF entre os diferentes genótipos para cada um dos polimorfismos. Para um valor de p significativo ($p < 0,05$), considerou-se estatisticamente diferente a média de HbF entre os diferentes grupos de genótipos.

- Estudos de associação, para testar a correlação entre variáveis independente (genótipos/haplótipos) e dependente (níveis quantitativos de HbF). Foram utilizados modelos de regressão linear, para todos os grupos em estudo. Para um valor de p significativo ($p < 0,05$) considerou-se existir associação entre variáveis independente e dependente (isto é, a primeira condiciona a segunda). Foi ainda utilizado o teste de associação caso-controlo no grupo populacional de indivíduos saudáveis, considerando o grupo “caso” com níveis aumentados de HbF ($>2\%$) e o grupo controlo com níveis normais de HbF ($<1,8\%$). Se é detetada uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre dois conjuntos de indivíduos então a diferença é considerada como indicador de associação, sendo possível estabelecer uma relação entre as duas variáveis.

A exploração de dados, elaboração de gráficos e testes T-Student e ANOVA para comparação de médias foram realizados no programa *Statistical Package for the Social Sciences* (IBM SPSS Statistics – v20). Os cálculos de frequências alélicas e haplotípicas, avaliação da concordância com a distribuição de Hardy-Weinberg (teste exato de Fisher), bem como os testes de associação segundo modelos de regressão linear (coeficiente de regressão; valor p teste Wald) e caso-controlo (teste chi-quadrado de Pearson; valores de Odds Ratio; IC 95%), foram realizados com o programa PLINK (www.pngu.mgh-harvard.edu/purcell/plink) (Purcell *et al.* 2007).

Resultados e Discussão

Resultados e discussão

1. Genotipagem

A Figura 8 mostra o padrão eletroforético obtido por SSCP para o SNP BCL11A rs11886868 onde se podem distinguir os diferentes genótipos.

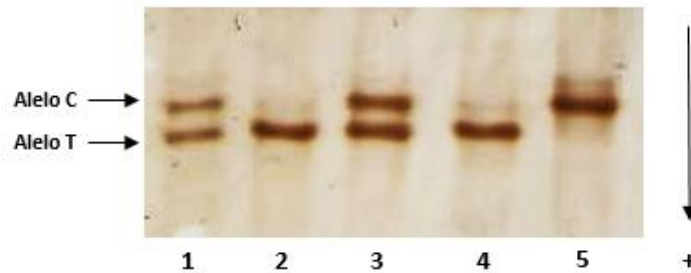


Figura 8: Genótipos obtidos para o SNP rs11886868 por SSCP. 2 e 4: indivíduos homocigóticos para alelo ancestral (T); 1 e 3: indivíduos heterocigóticos TC; 5: indivíduo homocigótico para alelo derivado (C).

A Figura 9 mostra o padrão eletroforético em gel de poliácridamida para o SNP BCL11A rs766432 após digestão com a enzima de restrição *Accl*.

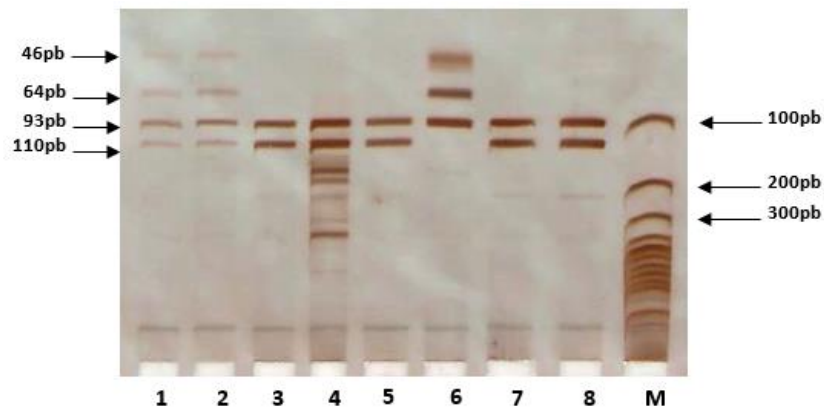


Figura 9: Genótipos obtidos para o SNP BCL11A rs766432 por eletroforese horizontal em gel de poliácridamida após digestão com *Accl*. 3, 4, 5, 7 e 8: indivíduos homocigóticos AA; 1 e 2: indivíduos heterocigóticos AC; 6: indivíduo homocigótico CC. M: marcador de peso molecular (100pb).

A Figura 10, ilustra os diferentes genótipos obtidos para o SNP HMIP rs9399137 por PCR em tempo real usando sondas TaqMan. A discriminação alélica foi efetuada através da análise da intensidade de fluorescência de cada uma das sondas.

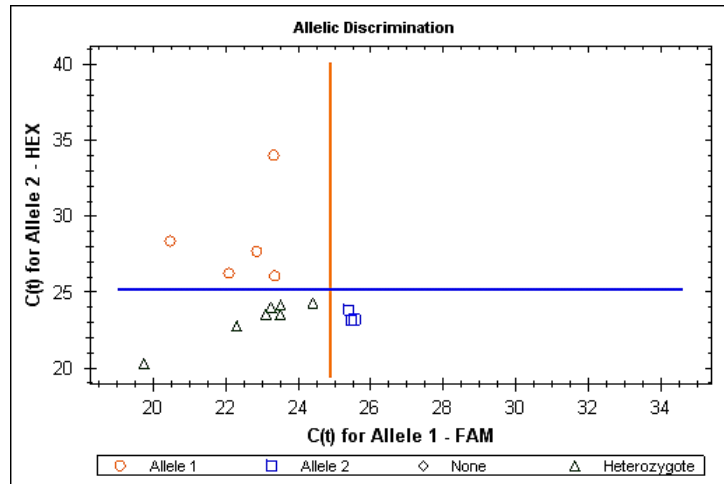


Figura 10: Genótipos obtidos para o SNP HMIP rs9399137 por PCR em tempo real usando sondas TaqMan. A fluorescência da sonda FAM identifica o alelo T e sonda Hex identifica o alelo C. Círculos: homocigóticos TT; Triângulos: heterocigóticos CT; Quadrados: homocigóticos CC.

A Figura 11 mostra o padrão eletroforético em gel de poliacrilamida para o SNP HMIP rs6934903 após digestão com a enzima de restrição HpyCh4III.

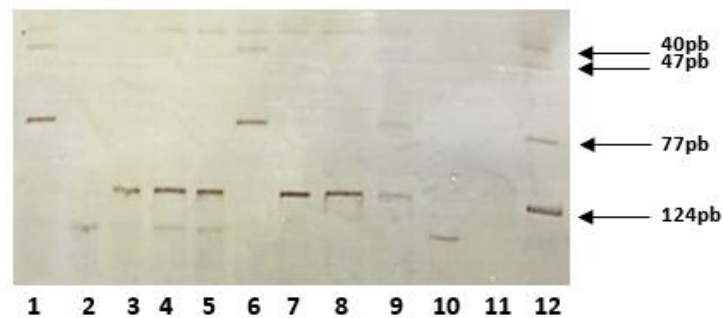


Figura 11: Genótipos obtidos para o SNP HMIP rs6934903 por eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida após digestão com HpyCh4III. 3, 4, 5, 7 e 8: indivíduos homocigóticos TT; 9 e 12: indivíduos heterocigóticos TA; 1 e 6: indivíduos homocigóticos AA.

Na Figura 12, podemos observar o padrão eletroforético obtido em gel de poliacrilamida dos fragmentos amplificados por PCR com os dois conjuntos de *primers* que identificam a deleção 3-pb no *locus* HMIP.

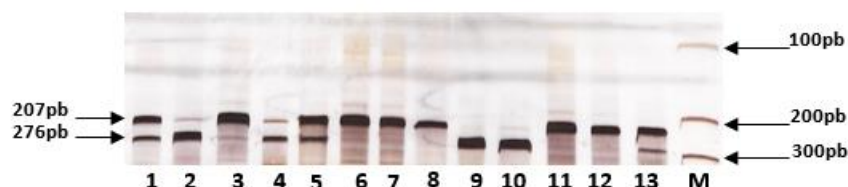


Figura 12: Genótipos obtidos para a deleção de 3-pb por eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida. 2, 4, 9 e 10: indivíduos homocigóticos para a deleção; 1, 5 e 13: indivíduos heterocigóticos; 3, 6, 7, 8, 11 e 12: indivíduos homocigóticos sem deleção. M: marcador para 100pb.

A Figura 13 mostra o padrão eletroforético em gel de poliacrilamida para o SNP HBG2 rs7482144 após digestão com a enzima de restrição XmnI.

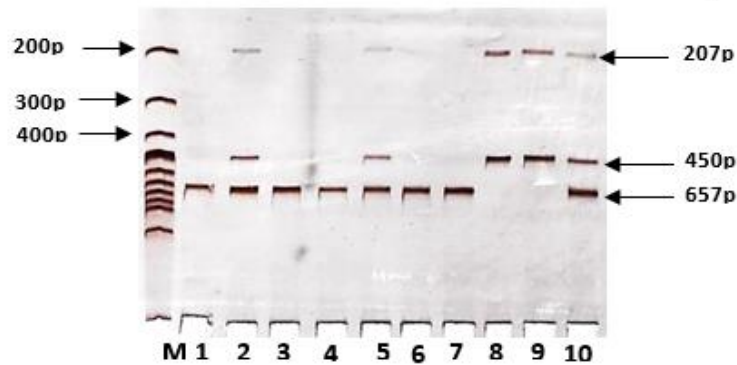


Figura 13: Genótipos obtidos para o SNP HBG2 rs7482144 por eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida após digestão com XmnI. 1, 3, 4, 6 e 7: indivíduos homocigóticos CC; 2, 5 e 10: indivíduos heterocigóticos TC; 8 e 9: indivíduos homocigóticos TT. M: marcador para 100pb.

A Figura 14 mostra resultados das reações de sequenciação para os SNPs rs6934903 e rs7482144. Para testar a eficácia da genotipagem pelos diferentes métodos foram sequenciadas cerca de 10% da totalidade das amostras, tendo sido sequenciadas amostras para todos os diferentes genótipos de cada um dos SNPs.

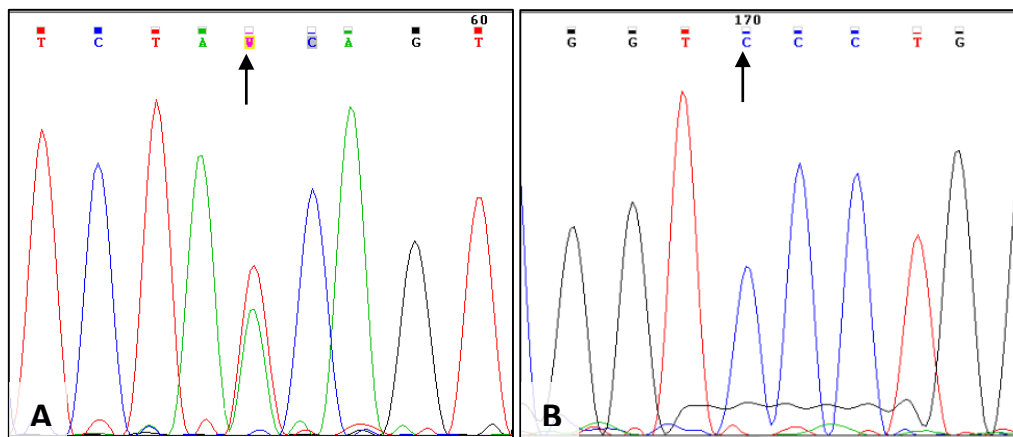


Figura 14: Exemplo de sequenciações. (A) sequenciação para rs6934903, com exibição de resultado heterocigótico. (B) sequenciação para rs7482144, com exibição de resultado homocigótico para alelo ancestral C. As sequências foram editadas através do software Chromas lite versão 2.1.1.

2. Análise estatística dos dados para os *loci* BCL11A, HMIP e HBG2 nos diferentes grupos populacionais

2.1 Grupo de indivíduos saudáveis com níveis aumentados de HbF (HPFH)

Foi analisado um conjunto de 60 indivíduos saudáveis, de origem portuguesa, com idades compreendidas entre os 2 e os 75 anos. Todos os indivíduos apresentam parâmetros hematológicos normais e níveis de HbF que variam entre 0,1% e 7,4 %.

A Tabela XI mostra a distribuição das frequências alélicas e genótípicas e o valor p do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para todos os polimorfismos estudados dos *loci* BCL11A, HMIP e HbG2 neste grupo populacional. O valor p HWE é superior a 0,05 em todos os SNPs, o que significa que não existem desvios significativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra populacional analisada.

Tabela XI: Distribuição de frequências alélicas e genótípicas no grupo de indivíduos com parâmetros hematológicos normais (n=60).

Chr	Gene	SNP	Alelos	Genótipos	p HWE
2	BCL11A	rs11886868	C: 0,417 T: 0,583	CC: 0,217 (13) CT: 0,40 (24) TT: 0,383 (23)	0.186
2	BCL11A	rs766432	C: 0,308 A: 0,692	CC: 0,133 (8) CA: 0,35 (21) AA: 0,516 (31)	0.222
6	HMIP	rs9399137	C: 0,233 T: 0,767	CC: 0,05 (3) CT: 0,366 (22) TT: 0,583 (35)	1
6	HMIP	rs6934903	A: 0,141 T: 0,859	AA: 0,033 (2) AT: 0,216 (13) TT: 0,75 (45)	0.319
11	HBG2	rs7482144	T: 0,30 C: 0,70	TT: 0,133 (8) CT: 0,333 (20) CC: 0,533 (32)	0.124

p HWE: valor de p para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A distribuição dos níveis de HbF (log-transformados) observados de acordo com os genótipos de cada um dos SNPs dos *loci* BCL11A, HMIP e HbG2 são mostrados na Figura 15.

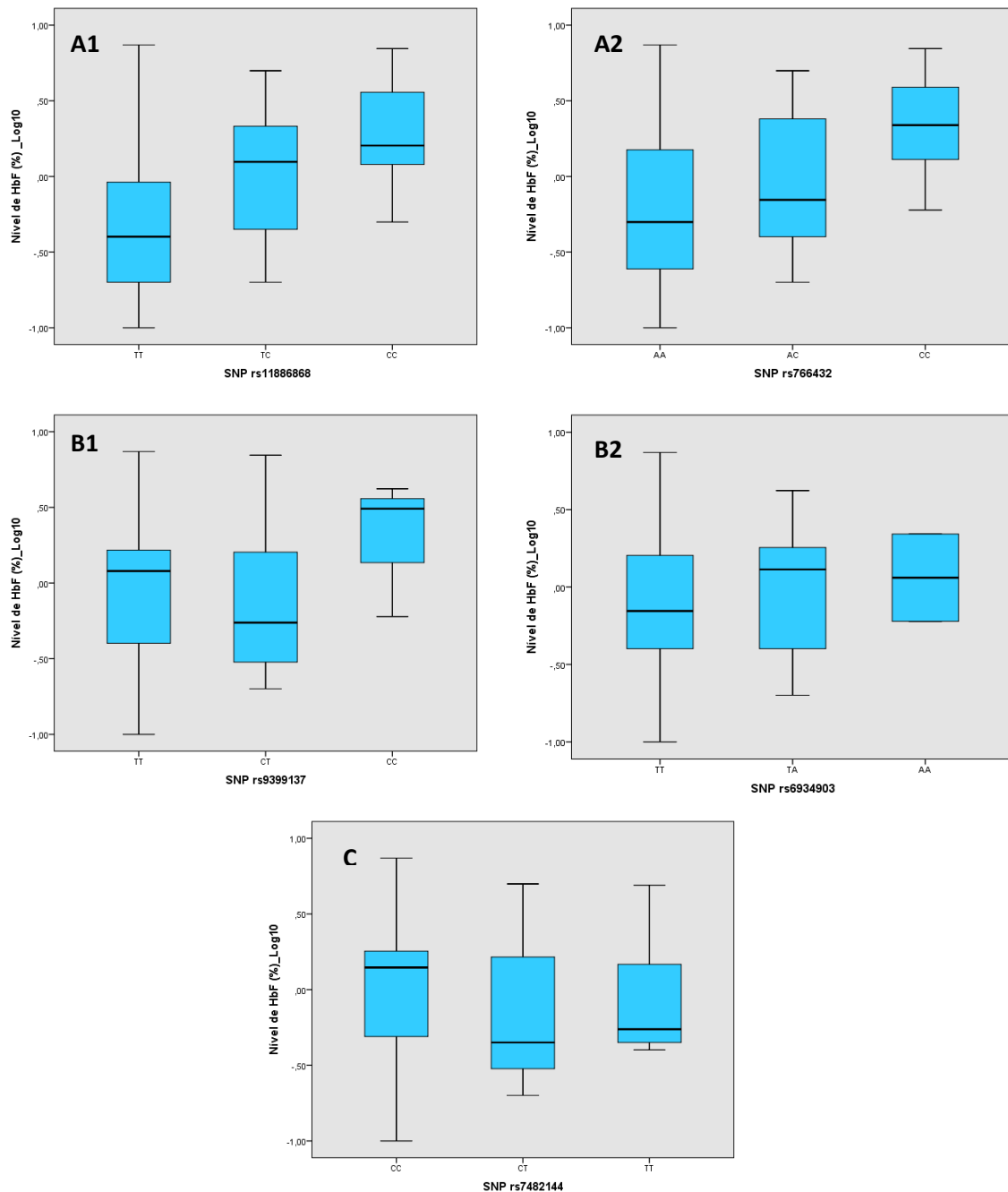


Figura 15: *Box-plots* mostrando a distribuição dos níveis de HbF (log-transformados) para cada genótipo de cada SNP estudado (grupo HPFH). **A1:** BCL11A rs1188686; **A2:** BCL11A rs766432; **B1:** HMIP rs9399137; **B2:** HMIP rs6934903; **C:** HbG2 (Xmnl; rs7482144).

Verificamos que para os polimorfismos do *locus* BCL11A, a distribuição dos níveis de HbF tende a aumentar para os genótipos heterozigóticos dos SNPs rs1188686 e rs766432 comparativamente ao genótipo ancestral, e para genótipos homozigóticos com alelo derivado, o nível de HbF eleva-se ainda mais. Para os restantes *loci*, HMIP e Xmnl, a distribuição do nível de HbF é semelhante para os diferentes genótipos de cada SNP.

Para verificar se existem diferenças significativas no nível de HbF (log-transformados) entre os diferentes genótipos de cada um dos SNPs, foi realizado o teste ANOVA de comparação de médias (Tabela XII). Podemos observar que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para os SNPs rs11886868 e rs766432 do *locus* BCL11A, confirmando a interpretação da exploração de dados através dos gráficos *box-plot*. Por outro lado, é possível verificar que para o SNP rs11886868 quer o genótipo TC quer o genótipo CC difere significativamente nos níveis de HbF do genótipo TT, homocigótico para o alelo ancestral. Já o SNP rs766432 mostra apenas diferença significativa nos níveis de HbF entre os dois genótipos homocigóticos CC vs. AA.

Para os polimorfismos dos *loci* HMIP e HBG2_Xmnl não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de HbF nos diferentes genótipos.

Tabela XII: Comparação da média dos níveis de HbF (log-transformados) entre os diferentes genótipos de cada SNP no grupo de indivíduos normal sem e com HPFH.

SNP		Genótipos Média HbF (%)			p*
BCL11A	rs11886868	TT (n=23) 0,887	TC (n=24) 1,637 p=0,009	CC (n=13) 2,392 p=0,000	P<0,001
	rs766432	AA (n=31) 1,039	AC (n=21) 1,705 p=0,202	CC (n=8) 2,85 p=0,008	
HMIP	rs9399137	TT (n=35) 1,506	TC (n=22) 1,373 p=0,797	CC (n=3) 2,633 p=0,450	p=0,336
	rs6934903	TT (n=45) 1,544	TA (n=13) 1,423 p=0,970	AA (n=2) 1,4 p=0,925	
HBG2	rs7482144	CC (n=32) 1,682	CT (n=20) 1,681 p=0,431	TT (n=8) 1,772 p=0,893	p=0,462

n: número de indivíduos da amostra para cada genótipo.

p: valor p de comparações múltiplas, obtido através do teste de Tukey, entre o genótipo homocigótico para o alelo ancestral e cada um dos genótipos heterocigótico e homocigótico para o alelo derivado.

p*: valor p do teste ANOVA.

Valores p significativos ($p < 0,05$) a negrito.

Os valores médios de HbF na Tabela são não-transformados.

A Tabela XIII, mostra os níveis de HbF em função da combinação genotípica para os dois SNPs BCL11A com significância estatística na associação ao nível de HbF. Verifica-se que o valor do nível de HbF em amostras com genótipos homocigóticos para o alelo

derivado em ambos os SNPs (CC/CC) é cerca de 3,4 vezes superior comparativamente aos genótipos homocigóticos ancestrais (AA/TT) (a negrito).

Tabela XIII: Médias de HbF por combinação de genótipos dos polimorfismos rs11886868|rs766432 e tamanho da amostra (n) (grupo HPFH).

		rs766432		
		AA	AC	CC
rs11886868	CC	1,9 (1)	1,6 (4)	2,85 (8)
	TC	1,41 (7)	1,73 (17)	-
	TT	0,84 (20)	-	-

Para melhor avaliar o efeito individual de cada um dos três *loci* nos níveis de HbF (Figura 18), selecionou-se um SNP de cada um dos *loci* (rs11886868, rs9399137 e rs7482144) e formaram-se 4 grupos de indivíduos: i) um grupo controle (ctr) composto por indivíduos homocigóticos para os alelos ancestrais de todos os *loci*; ii) um grupo (rs868) composto por indivíduos homocigóticos para os alelos ancestrais em todos os SNPs exceto rs11886868 (para o qual foram selecionados os indivíduos heterocigóticos e homocigóticos para o alelo derivado); iii) um grupo (rs137) composto por indivíduos homocigóticos para os alelos ancestrais em todos os SNPs exceto rs9399137 (para o qual foram selecionados os indivíduos heterocigóticos e homocigóticos para o alelo derivado); iv) um grupo (rs144) composto por indivíduos homocigóticos para os alelos ancestrais em todos os SNPs exceto rs7482144 (para o qual foram selecionados os indivíduos heterocigóticos e homocigóticos para o alelo derivado). A Figura 16 mostra a média dos níveis de HbF para cada um dos grupos considerados.

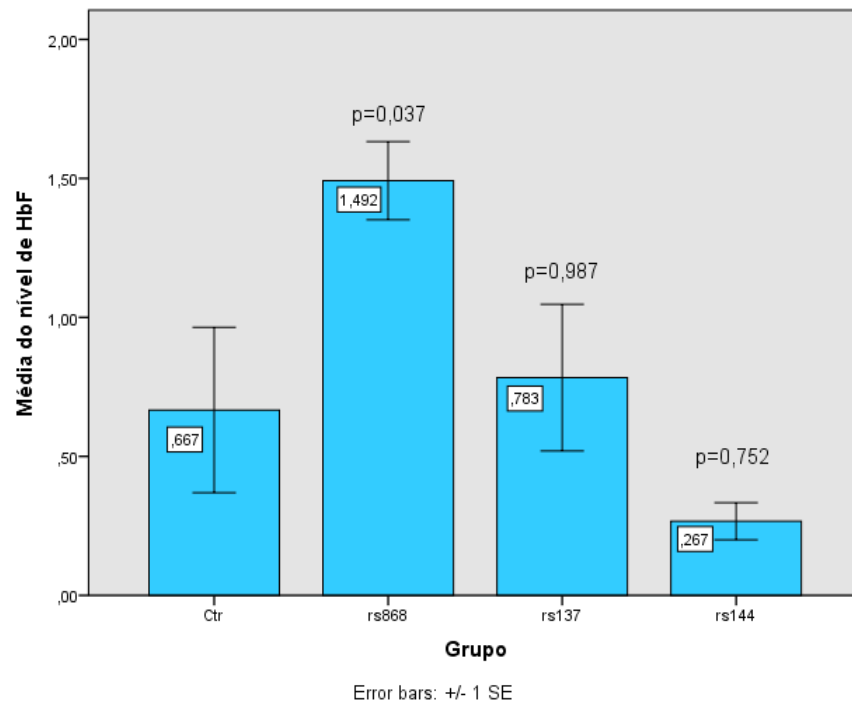


Figura 16: Média de HbF para de indivíduos agrupados segundo o seu genótipo considerando um dos SNPs de cada *loci* (grupo HPFH). Ctrl: homocigóticos para o alelo ancestral (n=6); rs868, homocigóticos para os alelos ancestrais de todos os SNPs exceto rs11886868 (n=12); rs137, homocigóticos para os alelos ancestrais de todos os SNPs exceto rs9399137 (n=6); rs144, homocigóticos para os alelos ancestrais de todos os SNPs exceto rs7482144 (n=3). O valor p mostra o resultado do teste de comparação entre as médias de cada um dos grupos relativamente ao grupo controlo.

Verifica-se que o grupo dos indivíduos homocigóticos e heterocigóticos para o alelo derivado do SNP rs11886868 apresenta mais do dobro (cerca de 2,2x) de HbF em comparação com o grupo normal, sendo a diferença estatisticamente significativa ($p=0,037$). Por sua vez, o grupo dos indivíduos homocigóticos e heterocigóticos para o alelo derivado do SNP rs9399137 apresenta níveis de HbF semelhante ao grupo normal, e o grupo dos indivíduos homocigóticos e heterocigóticos para o alelo derivado do SNP rs7482144 apresenta níveis de HbF inferior em comparação com o grupo normal. Para estes polimorfismos não se encontram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controlo ($p=0,987$, para rs9399137 e $p=0,752$, para rs7482144).

Para testar a associação dos polimorfismos aos níveis de HbF recorreu-se a modelos de regressão linear com os dados quantitativos de HbF (log-transformados). Foram obtidos valores de p estatisticamente significativos para os dois polimorfismos do *locus* BCL11A: rs11886868 ($7,30 \times 10^{-5}$) e rs766432 ($p=0,002$) (Tabela XIV), confirmando a associação destes dois polimorfismos ao aumento dos níveis de HbF. Os

valores da associação mantêm-se estatisticamente significativos após ajustamento para o género e idade: $p=2,91 \times 10^{-5}$ e $p=0,005$ para rs11886868 e rs766432, respetivamente. Para estes dois SNPs associados ao aumento de HbF, foram ainda obtidos valores Beta positivos (0,30 e 0,26, respetivamente), o que indica que os alelos *minor* destes SNPs exercem um efeito positivo no aumento dos níveis de HbF. Verifica-se que individualmente o SNP rs11886868 é responsável por 23,93% da variabilidade de HbF e o SNP rs766432 por 15,3% (Tabela XIV).

Por sua vez, os valores de p mostram que não existe significância para os *loci* HMIP e XmnI confirmando a não associação destes SNPs ao aumento de HbF revelada nos outros testes estatísticos.

Tabela XIV: Resultados do teste de associação por regressão linear para os diferentes *loci* em estudo (grupo HPFH).

Chr	Gene	SNP	Posição	N	MAF (alelo)	Beta	SE	Variância explicada (%)	p
2	BCL11A	rs11886868	60720246	60	0,417 (C)	0,30	0,070	23,93	$7,30 \times 10^{-5}$
2	BCL11A	rs766432	60719970	60	0,308 (C)	0,26	0,079	15,3	0,002
6	HMIP	rs9399137	135419018	60	0,233 (C)	0,029	0,103	0,13	0,78
6	HMIP	rs6934903	135451564	60	0,142 (A)	0,047	0,118	0,27	0,69
11	HBG2	rs7482144	5276169	60	0,300 (T)	-0,075	0,085	1,3	0,38

MAF: frequência do alelo *minor* (entre parêntesis);

N: número de amostras;

Beta: coeficiente de correlação;

SE: Erro padrão.

Valores de Beta e p são relativos ao alelo *minor*.

Foi ainda analisada a associação dos polimorfismos à HbF através do modelo caso-controlo, considerando como fenótipo HbF normal valores de HbF $<1,8\%$ e fenótipo HbF aumentada valores de HbF $\geq 2\%$. Os resultados apresentados na Tabela XV mostram valores significativos de associação para os polimorfismos BCL11A rs766432 ($p=0,002$) e rs11886868 ($p=0,001$), continuando a registar-se valores de p não significativos para os restantes SNPs (HMIP rs9399137 $p=0,31$, rs6934903 $p=0,29$; e HBG2 rs7482144 $p=1$).

Tabela XV: Teste de associação segundo modelo caso/controle, considerando o subgrupo com HbF normal (< 1,8%) versus subgrupo com HbF elevada (≥2%) (grupo HPFH).

	SNPs	Alleles	Fenótipo		OR (95% CI)
			HbF < 1,8% (N=40)	HbF ≥2% (N=15)	Normal vs, Elevada
BCL11A	rs11886868	C	0,333	0,667	4 (1,66- 9,61) p=0,0013
		T	0,667	0,333	
BCL11A	rs766432	C	0,233	0,533	3,7 (1,57-8,94) p=0,0021
		A	0,767	0,467	
HMIP	rs9399137	C	0,211	0,300	1,6 (0,63-4,06) p=0,318
		T	0,789	0,700	
HMIP	rs6934903	A	0,122	0,200	1,79 (0,60-5,36) p=0,290
		T	0,878	0,800	
HBG2	rs7482144	T	0,300	0,300	1 (0,405-2,464) p=1
		C	0,700	0,700	

Abreviaturas: OR, odds ratio; CI, intervalo de confiança.

Valores OR são relativos ao menor alelo

Os valores de p significativos ($p < 0,05$) a negrito

Na análise haplotípica, com determinação de haplótipos por inferência estatística, observa-se a presença de três haplótipos considerando os dois SNPs rs11886868/rs766432 do *locus* BCL11A (CC: 0.308; CA: 0.108; TA: 0.583), com um valor de desequilíbrio gamético $r^2=0,66$ (Tabela XVI). Para os dois polimorfismos do *locus* HMIP rs9399137/rs6934903, observa-se a inferência de quatro haplótipos (CA: 0.083; TA: 0.0587; CT: 0.15; TT: 0.708), com um valor de desequilíbrio gamético $r^2=0,108$ (Tabela XVI).

Tabela XVI: Frequências haplotípicas para os loci BCL11 e HMIP, valores r^2 de desequilíbrio gamético e testes de associação aos níveis de HbF (grupo HPFH).

		BCL11 rs11886868		LD r^2 rs868 rs432
		T	C	
BCL11 rs766432	A	0,583* p=7,30X10⁻⁵	0,108* p=0,11	0,660
	C		0,308* p=0,002	

		HMIP rs9399137		LD r^2 rs137 rs903
		T	c	
HMIP rs6934903	T	0,708* p=0,88	0,15* p=0,46	0,108
	A	0,058* p=0,72	0,083* p=0,81	

*Frequência dos haplótipos;

p, associação entre haplótipos e HbF;

LD, desequilíbrio gamético.

Na análise da associação dos haplótipos aos níveis de HbF (log-transformados) verificam-se valores estatisticamente significativos para os haplotipos BCL11A: i) CC (com ambos os alelos derivados) ($p=0,002$) e um valor de correlação positivo (0,256), que mostra que este haplótipo está positivamente associado ao aumento de HbF; ii) TA, (constituído pelos dois alelos ancestrais) ($p=7,30 \times 10^{-5}$) com um valor de correlação negativo (-0.301) e portanto negativamente associado aos níveis de HbF. Para o haplotipo CA, com apenas um dos alelos derivados, não foi encontrada correlação significativa com o nível de HbF ($p= 0.11$). Para os haplótipos do *locus* HMIP não se verifica valor significativo de associação aos níveis de HbF em qualquer um dos haplótipos encontrados.

Assim, todos os testes estatísticos efetuados neste grupo de indivíduos saudáveis, sem e com HPFH, mostram que os SNPs do *loci* BCL11A se encontram associados ao aumento dos níveis de HbF. Pelo contrário, neste grupo populacional não foi encontrada qualquer associação entre os polimorfismos HMIP e XmnI e os níveis de HbF.

Os resultados obtidos estão de acordo com outros estudos (Uda *et al.*, 2007) que mostram o *locus* BCL11A como um dos responsáveis pela variabilidade de HbF em indivíduos com HPFH naturais da Sardenha. Por outro lado, os nossos resultados para o *locus* XmnI estão de acordo com a generalidade dos dados publicados que mostram que este SNP não influencia os níveis de HbF em indivíduos normais (Sampietro *et al.*, 1992; Guida *et al.*, 2006; Dabke *et al.*, 2013). Por outro lado, não confirmam os resultados obtidos por Jouini *et al* (2011) que encontraram o polimorfismo XmnI associado ao aumento dos níveis de HbF em indivíduos normais adultos originários da Tunísia.

2.1 Grupo de doentes com β -talassemia minor

Foram analisados um total de 42 indivíduos, diagnosticados com β -talassemia minor, e com níveis de HbF entre 0,2% e 9,5 %, e idades compreendidas entre os 2 e os 77 anos. A tabela XVII mostra a distribuição das frequências alélicas e genótípicas e o valor p do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para todos os polimorfismos estudados dos *loci* BCL11A, HMIP e HbG2 no total da população. O valor p HWE é superior a 0,05 em todos os SNPs, o que significa que na amostra populacional não existem desvios significativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela XVII: Distribuição de frequências alélicas e genótípicas no grupo de indivíduos com β -talassemia minor (n=42).

Chr	Gene	SNP	Alelos	Genótipos	P HWE
2	BCL11A	rs11886868	C: 0,25 T: 0,75	CC: 0,047 (n=2) CT: 0,404 (n=17) TT: 0,547 (n=23)	1
2	BCL11A	rs766432	C: 0,154 A: 0,846	CC: 0,023 (n=1) CA: 0,261 (n=11) AA: 0,714 (n=30)	1
6	HMIP	rs9399137	C: 0,25 T: 0,75	CC: 0,095 (n=4) CT: 0,309 (n=13) TT: 0,595 (n=25)	0,24
6	HMIP	rs6934903	A: 0,119 T: 0,881	AA: 0,023 (n=1) AT: 0,190 (n=8) TT: 0,785 (n=33)	0,45
11	HbG2	rs7482144	T: 0,178 C: 0,822	TT: 0,047 (n=2) CT: 0,261 (n=11) CC: 0,690 (n=29)	0,59

p HWE: valor de p para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A distribuição dos níveis de HbF (log-transformados) de acordo com os genótipos de cada um dos SNPs dos *loci* BCL11A, HMIP e HbG2 são mostrados na Figura 17, tendo sido agrupados os indivíduos heterozigóticos e homozigóticos para o alelo derivado.

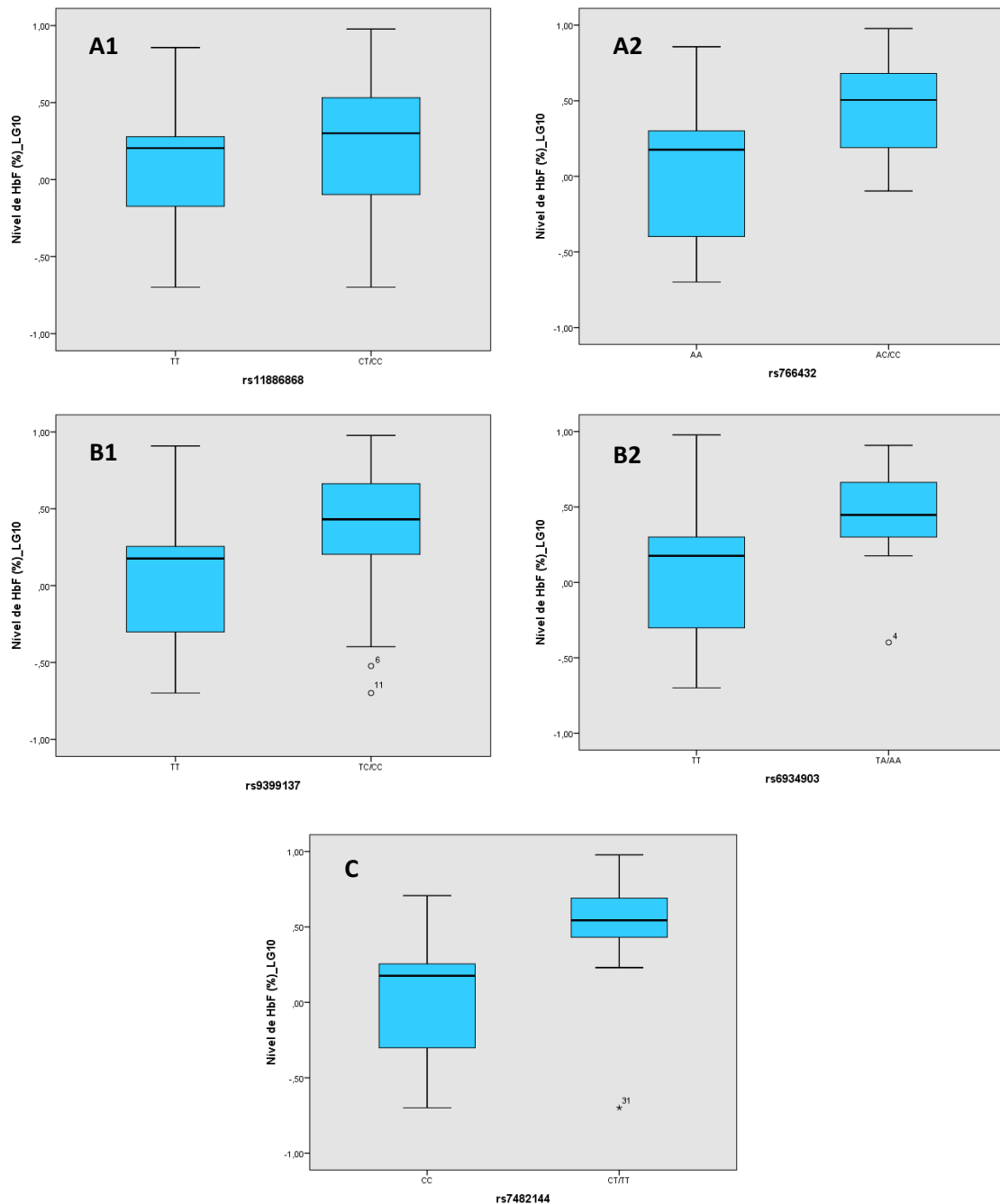


Figura 17: *Box-plots* mostrando a distribuição do nível de HbF (log-transformada) para os genótipos de cada SNP, considerando o genótipo homocigótico com alelo ancestral versus o conjunto dos genótipos homocigótico e heterocigótico com o alelo derivado (grupo β -talassémia menor). **A1:** BCL11A rs11886868; **A2:** BCL11A rs766432; **B1:** HMIP rs9399137; **B2:** HMIP rs6934903; **C:** Xmn1 rs7482144.

A exploração estatística de dados através de gráficos *box-plot* para os diferentes polimorfismos, mostra que os níveis de HbF são mais elevados para a generalidade dos SNPs no conjunto dos genótipos homocigótico/heterocigótico para o alelo derivado, em relação ao genótipo homocigótico para o alelo ancestral.

Para verificar se existem diferenças no nível de HbF entre os genótipos, foi realizado o teste *t*-Student para comparar médias de HbF (log-transformadas) entre os dois grupos de genótipos considerados para cada SNP (Tabela XVIII).

Tabela XVIII: Média do nível de HbF para os dois grupos de genótipos em cada SNP e comparação das médias dos níveis de HbF (log-transformados) entre os dois grupos de genótipos (grupo β -talassémia menor).

SNP		Genótipos HbF %		p
BCL11A	rs11886868	TT (n=23)	TC+CC (n=19)	0,354
		1,857	2,742	
	rs766432	AA (n=30)	AC+CC (n=12)	0,003
		1,663	3,742	
HMIP	rs9399137	TT (n=25)	TC+CC (n=17)	0,079
		1,780	2,959	
	rs6934903	TT (n=33)	TA+AA (n=9)	0,056
		1,970	3,311	
HBG2	rs7482144	CC (n=29)	CT+TT (n=13)	<0,001
		1,372	4,231	

n: número de indivíduos da amostra para cada genótipo.

p*: valor p do *t*-teste.

Valores p significativos a negrito.

Valores de HbF na Tabela não-transformados.

Podemos observar através do teste *t* (Tabela XVIII) que existe significância para os SNPs BCL11A rs766432 ($p=0,003$) e XmnI rs7482144 ($p<0,001$), em concordância com a distribuição de HbF observada nos gráficos *box-plot*. Para os SNPs dos *loci* BCL11A rs11886868 e HMIP rs9399137 e rs6934903, não se verificaram valores de *p* estatisticamente significativos ($p> 0,05$) (Tabela XVIII).

Para os polimorfismos BCL11A rs766432 e HBG2 rs7482144, significativamente associados aos níveis de HbF, o conjunto dos genótipos heterozigótico/homozigótico para os alelos derivados apresenta cerca de 2,25x (rs766432) e 3x (rs7482144) mais HbF, comparativamente ao genótipo homozigótico para o alelo ancestral (Tabela XVIII).

Adicionalmente, para melhor avaliar o efeito individual de cada um dos três *loci* BCL11A, HMIP e XmnI, selecionou-se um SNP de cada um (rs766432, rs6934903 e rs7482144, respetivamente) e formaram-se 4 grupos mediante seleção de amostras: i) um grupo controlo (ctr) composto por indivíduos homozigóticos para os alelos ancestrais de todos os *loci*; ii) um grupo (rs432) composto por indivíduos homozigóticos para os alelos ancestrais em todos os SNPs exceto rs766432 (para o qual foram

selecionados os indivíduos heterozigóticos e homozigóticos para o alelo derivado; iii) um grupo (rs903) composto por indivíduos homozigóticos para os alelos ancestrais em todos os SNPs exceto rs6934903 (para o qual foram selecionados os indivíduos heterozigóticos e homozigóticos para o alelo derivado; iv) um grupo (rs144) composto por indivíduos homozigóticos para os alelos ancestrais em todos os SNPs exceto rs7482144 (para o qual foram selecionados os indivíduos heterozigóticos e homozigóticos para o alelo derivado). A Figura 18 mostra a média dos níveis de HbF para cada um dos grupos considerados verificando-se que o grupo dos indivíduos homozigóticos para o alelo derivado do SNP XmnI (rs7482144) apresenta cerca de quatro vezes (3,9x) mais HbF em comparação com o grupo normal, sendo a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Por sua vez, os grupos dos indivíduos homozigóticos para o alelo derivado dos SNP BCL11A rs766432 e HMIP rs6934903 apresentam níveis de HbF ligeiramente superiores ao grupo normal, com diferença não estatisticamente significativas ($p=0,722$ e $p=0,691$, respetivamente).

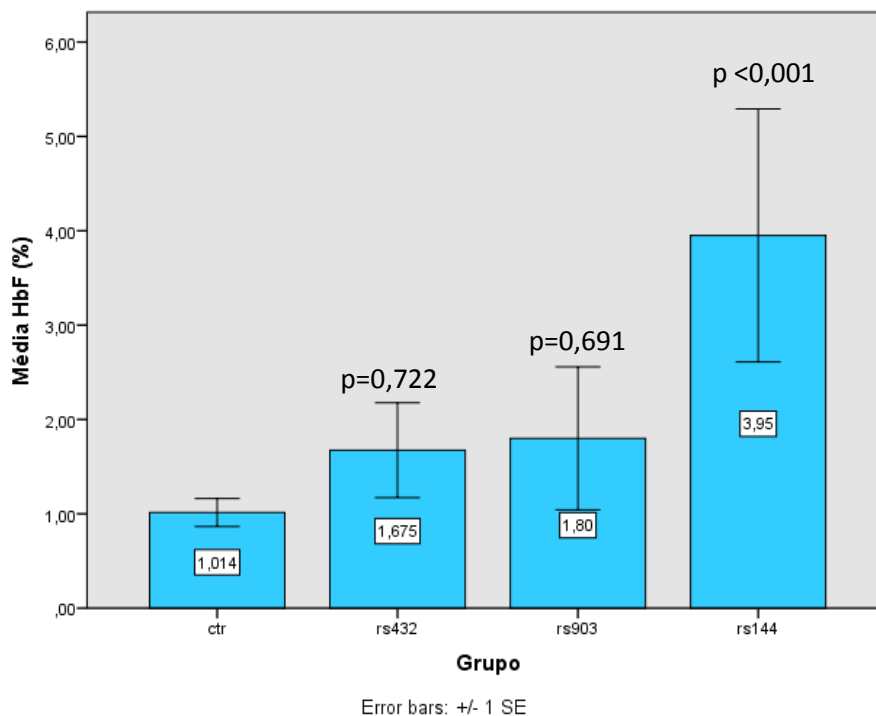


Figura 18: Média de HbF para de indivíduos agrupados segundo o seu genótipo considerando um dos SNPs de cada *loci* (grupo β -talassémia menor). Ctr: homozigóticos para o alelo ancestral (n=21); rs432, homozigóticos para os alelos ancestrais de todos os SNPs exceto rs766432 (n=4); rs903, homozigóticos para os alelos ancestrais de todos os SNPs exceto rs6934903 (n=3); rs144, homozigóticos para os alelos ancestrais de todos os SNPs exceto rs7482144 (n=4). O valor p mostra o resultado to teste de comparação entre as médias de cada um dos grupos relativamente ao grupo controlo.

Nos testes de associação recorrendo a modelos de regressão linear com os dados quantitativos de HbF (log-transformados), foram obtidos valores de *p* estatisticamente significativos para o polimorfismo do *locus* BCL11A rs766432 ($p=0,001$) e para o *locus* HBG2 rs7482144 ($p=2,267 \times 10^{-6}$) (Tabela XIX), confirmando a associação destes dois polimorfismos ao aumento dos níveis de HbF verificada por comparação dos genótipos. A associação mantém-se estatisticamente significativa após ajustamento para o género e idade ($p=0,00049$ e $p=7,39 \times 10^{-6}$ para rs766432 e rs7482144, respetivamente). Os valores de Beta positivos (0,41 e 0,50) indicam que os alelos *minor* destes SNPs exercem efeito positivo no aumento de HbF.

Tabela XIX: Resultados do teste de associação por regressão linear para os diferentes *loci* em doentes de origem portuguesa com β -talassemia *minor*.

Chr	Gene	SNP	Posição	N	MAF (alelo)	Beta	SE	Variância explicada (%)	p
2	BCL11A	rs11886868	60720246	42	0,25 (C)	0,14	0,12	3,7%	0,221
2	BCL11A	rs766432	60719970	42	0,154 (C)	0,41	0,12	22,8%	0,001
6	HMIP	rs9399137	135419018	42	0,25 (C)	0,16	0,10	6,1%	0,114
6	HMIP	rs6934903	135451564	42	0,119 (A)	0,25	0,14	7,3%	0,082
11	HBG2	rs7482144	5276169	42	0,177 (T)	0,50	0,09	43,2%	$2,26 \times 10^{-6}$

MAF: frequência do alelo *minor* (entre parêntesis);

N: número de amostras;

Beta: coeficiente de correlação;

SE: Erro padrão.

Valores de Beta e *p* são relativos ao alelo *minor*.

Verifica-se que individualmente o SNP rs7482144 é responsável por 43,2% da variabilidade de HbF, e o SNP rs766432 por 22,8% (Tabela XIX).

Na determinação de haplótipos por inferência estatística (Tabela XX), observa-se a presença de três haplótipos considerando os dois SNPs rs11886868/rs766432 do *locus* BCL11A (CC: 0.001; CA: 0.031; TA: 0.221), com um elevado valor de desequilíbrio gamético $r^2=0,57$, e para os dois polimorfismos do *locus* HMIP rs9399137/rs6934903, observa-se a inferência de quatro haplotipos (CA: 0,187; TA: 0,117; CT: 0,355; TT: 0,047), com um valor de desequilíbrio gamético $r^2=0,14$.

Tabela XX: Frequências haplotípicas para os *loci* BCL11 e HMIP, valores r^2 de desequilíbrio gamético e testes de associação aos níveis de HbF (grupo β -talassémia menor).

		BCL11 rs11886868		LD rs868 rs432
		T	C	
BCL11 rs766432	A	0,75* p=0,22	0,09* p=0,03	0,567
	C		0,15* p=0,001	

		HMIP rs9399137		LD Rs137 rs903
		T	C	
HMIP rs6934903	T	0,72* p=0,047	0,15* p=0,36	0,140
	A	0,02* p=0,12	0,09* p=0,19	

*Frequência dos haplótipos;

p, associação entre haplótipos e HbF;

LD, desequilíbrio gamético.

Na análise da associação dos haplótipos aos níveis de HbF (log-transformados) verificam-se valores de associação estatisticamente significativos para o haplótipo CC, com os alelos derivados de ambos os polimorfismos (rs1188868_C/rs766432_C) (p=0,001), com coeficiente de correlação positivo (0,411). Também o haplótipo AC, com o alelo ancestral do polimorfismo rs766432_A e alelo derivado rs1188868_C mostra associação significativa (p=0,03), mas com coeficiente de correlação negativo (-0,374), o que indica que está negativamente associado aos níveis de HbF, contrariamente ao haplotipo CC. Este resultado está de acordo com valores de p significativos encontrados no teste de regressão linear para o SNP rs766432, e não significativos para rs1188868, ambos do *locus* BCL11A.

No *locus* HMIP foi encontrada associação aos níveis de HbF para o haplotipo TT (p=0,047), com alelos ancestrais de ambos os polimorfismos (rs9399137_T/rs6934903_T), mas com coeficiente de correlação negativo (-0,193), o que indica que está negativamente associado à HbF.

Assim, todos os testes estatísticos efetuados no grupo de indivíduos diagnosticados com β -talassemia *minor* da região centro de Portugal mostram que o SNP do *locus* HBG2 XmnI_rs7482144 é o que se encontra mais associado ao aumento dos níveis de HbF, seguido do *locus* BCL11A rs766432. Relativamente ao SNP rs766432,

os nossos resultados estão em concordância com os obtidos por Farrel *et al.* (2011) que encontrou o mesmo SNP BCL11A como o mais significativamente associado à HbF em heterozigóticos para β -talassemia de origem Chinesa. Todavia não foi possível confirmar o mesmo nível de associação para o SNP HMIP rs9399137, também encontrado por Farrel *et al.* (2011) fortemente associado ao nível de HbF. Relativamente ao SNP XmnI_rs7482144 os nossos resultados são semelhantes aos encontrados noutros estudos em heterozigóticos para β -talassemia originários da Índia (Dabke *et al.*, 2013) ou Itália (Guida *et al.*, 2006), em que o alelo T do polimorfismo XmnI se observa fortemente associado aos níveis de HbF.

2.2 Grupo de doentes com β -talassemia intermédia

Foram analisados um total de 18 indivíduos diagnosticados com β -talassemia intermédia, com níveis de HbF entre 4,6% e 50%, e idades compreendidas entre 22 e 62 anos. Os valores de HbF considerados foram estimados pré-administração de hidroxiureia em nove doentes correntemente submetidos a este tratamento. A Tabela XXI mostra a distribuição das frequências alélicas e genóticas e o valor p do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para todos os polimorfismos estudados dos *loci* BCL11A, HMIP e HbG2. O valor p HWE é superior a 0,05 em todos os SNPs o que significa que não existem desvios significativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo populacional.

Tabela XXI: Distribuição de frequências alélicas e genóticas no grupo de indivíduos com β -talassemia intermédia (n=20)

Ch r	Gene	SNP	Alelos	Genótipos	p HWE
2	BCL11A	rs11886868	C: 0,42 T: 0,58	CC: 0,10 (n=2) CT: 0,65 (n=11) TT: 0,25 (n=5)	0,62
2	BCL11A	rs766432	C: 0,28 A: 0,72	CC: 0,05 (n=1) CA: 0,45 (n=8) AA: 0,50 (n=9)	1
6	HMIP	rs9399137	C: 0,19 T: 0,81	CC: 0,10 (n=2) CT: 0,25 (n=3) TT: 0,65 (n=13)	0,09
6	HMIP	rs6934903	A: 0,11 T: 0,89	AA: 0,05 (n=0) AT: 0,25 (n=4) TT: 0,70 (n=14)	1
11	HbG2	rs7482144	T: 0,03 C: 0,97	TT: 0 (n=0) CT: 0,05 (n=1) CC: 0,95 (n=17)	1

p HWE: valor de p para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A distribuição dos níveis de HbF (log-transformados) de acordo com os genótipos de cada um dos SNPs dos *loci* BCL11A, HMIP e HbG2 são mostrados na Figura 19, tendo sido agrupados os indivíduos heterozigóticos e homozigóticos para o alelo derivado.

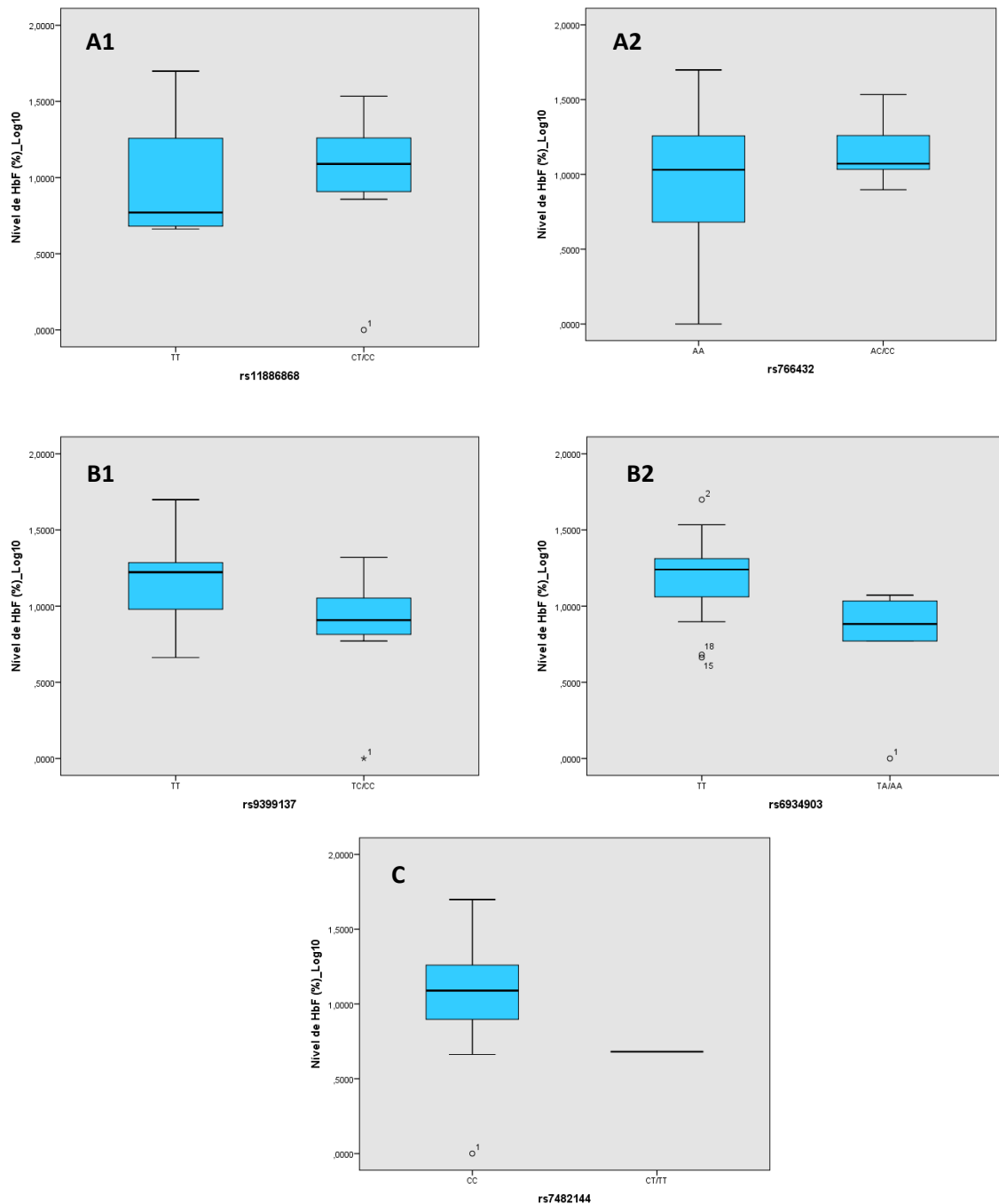


Figura 19: *Box-plots* mostrando a distribuição dos níveis de HbF (log-transformados) em doentes com β -talassemia intermédia para os genótipos de cada SNP (os indivíduos com os genótipos homozigóticos e heterozigóticos para o alelo derivado foram agrupados). **A1:** BCL11A rs11886868; **A2:** BCL11A rs766432; **B1:** HMIP rs9399137; **B2:** HMIP rs6934903; **C:** Xmn1 rs7482144.

Através da observação dos gráficos *box-plot*, é possível verificar que não existem diferenças acentuadas na distribuição dos níveis de HbF entre os diferentes genótipos dos polimorfismos BCL11A rs1188868 e rs766432. Para os polimorfismos HMIP rs9399137 e rs6934903, o conjunto dos genótipos heterozigótico/homozigótico para os alelos derivados mostram níveis de HbF ligeiramente diminuídos.

O teste *t*-Student de comparação de médias de HbF (log-transformadas) (Tabela XXII) revela que não existem diferenças estatisticamente significativas ($0,121 \leq p \leq 0,833$) entre os dois grupos de genótipos considerados para qualquer um dos SNPs, estando estes resultados em concordância com a distribuição observada nos gráficos *box-plot*.

Tabela XXII: Média do nível de HbF nos diferentes genótipos para cada SNP e comparação das médias dos níveis de HbF (log-transformados) entre os dois grupos de genótipos (grupo β -talassemia intermédia).

SNP		Genótipos HbF %		p
BCL11A	rs11886868	TT (n=5)	TC+CC (n=13)	p=0,637
		16,6	14,7	
	rs766432	AA (n=9)	AC+CC (n=9)	p=0,833
		16,0	14,5	
HMIP	rs9399137	TT (n=13)	TC+CC (n=5)	p=0,316
		17,1	10,6	
	rs6934903	TT (n=14)	TA+AA (n=4)	p=0,121
		17,4	8,0	
HBG2	rs7482144	CC (n=17)	CT (n=1)	p=0,148
		15,9	4,8	

Média de HbF: valores não transformados;

Valores p do t teste, efetuado com dados HbF log-transformados

Nos testes de associação aos níveis de HbF efetuados com modelos de regressão linear (Tabela XXIII) também não foram encontrados valores de p significativos para qualquer dos SNP estudados ($p > 0,05$).

Curiosamente, a frequência do alelo *minor* T do *locus* Xmn1_rs7482144 é muito baixa neste grupo populacional, o que pode ficar a dever-se ao facto de existir desequilíbrio gamético entre o alelo C do polimorfismo Xmn1 e a mutação c.92+6T>C, que constitui em homozigotia o genótipo da maioria dos doentes deste grupo (14 num total de 18).

Tabela XXIII: Resultados do teste de associação por regressão linear para os diferentes *loci* em doentes com β -talassemia intermédia de origem portuguesa.

Chr	Gene	SNP	Posição	N	MAF (allele)	Beta	SE	Variância (%)	p
2	BCL11A	rs11886868	60720246	18	0,417 (C)	4,002	2,08	18,7	0,072
2	BCL11A	rs766432	60719970	18	0,278 (C)	1,153	2,30	1,5	0,625
6	HMIP	rs9399137	135419018	18	0,194 (C)	-0,639	2,04	0,06	0,758
6	HMIP	rs6934903	135451564	18	0,111 (A)	-4,206	3,17	9,8	0,203
11	HBG2	rs7482144	5276169	18	0,027 (T)	-6,149	5,79	6,4	0,310

MAF: frequência do alelo *minor* (entre parêntesis);

N: número de amostras;

Beta: coeficiente de correlação;

SE: Erro padrão.

Valores de Beta e p são relativos ao alelo *minor*.

Na análise haplotípica, a determinação por inferência estatística revela a presença de três haplótipos considerando os dois SNPs rs11886868/rs766432 do *locus* BCL11A (CC: 0.27; CA: 0.13; TA: 0.58), com um valor de desequilíbrio gamético $r^2=0,519$ (Tabela XXIV). Para os dois polimorfismos do *locus* HMIP rs9399137/rs6934903, foram deduzidos também três haplótipos (com frequência superior a 1%) (CA: 0.11; CT: 0.08; TT: 0.80) com um valor de desequilíbrio gamético $r^2=0,46$ ligeiramente inferior (Tabela XXIV). O teste estatístico de associação aos níveis de HbF não mostrou valores significativos para qualquer haplótipo de ambos os *loci* ($p > 0,05$).

Tabela XXIV: Frequências haplotípicas para os *loci* BCL11 e HMIP, valores r^2 de desequilíbrio gamético e testes de associação aos níveis de HbF (grupo β -talassémia intermédia).

		BCL11 rs11886868		LD r^2 rs868 rs432
		T	C	
BCL11 rs766432	A	0,589* p=0,072	0,139* p=0,087	0,519
	C	/	0,278* p=0,625	

		HMIP rs9399137		LD r^2 rs137 rs903
		T	C	
HMIP Rs693490 3	T	0,806* p=0,758	0,083* p=0,537	0,460
	A	/	0,111* p=0,203	

*Frequência dos haplótipos;

p, associação entre haplótipos e HbF;

LD, desequilíbrio gamético.

Assim, o estudo realizado com o grupo de doentes diagnosticados com β -talassemia intermédia da região centro de Portugal, não mostra valores significativos de associação aos níveis de HbF para os polimorfismos dos diferentes *loci*, em qualquer dos testes estatísticos efetuados. Assim, os dados obtidos no presente trabalho não replicam os observados para os mesmos polimorfismos noutras populações de doentes com β -talassemia (Uda *et al.*, 2008), embora outros estudos recentes em grupos populacionais com β -talassemia intermédia também não tenham encontrado associação dos polimorfismos BCL11A e HMIP aos níveis de HbF (Nguyen *et al.*, 2010). Consideramos, no entanto, que a ausência de associação à HbF agora verificada para os polimorfismos estudados neste grupo populacional de naturalidade Portuguesa pode ficar a dever-se ao reduzido tamanho da amostra (apenas 18 doentes).

Por outro lado, a ausência de influência nos níveis de HbF verificada para o *locus* XmnI é resultado da homogeneidade haplotípica observada na nossa população, com 14 dos 18 doentes homozigóticos para a mutação c.92+6T>C no gene β -globínico. Verifica-se que esta mutação se encontra em ligação completa ao alelo C do SNP XmnI, registando-se apenas a presença de um genótipo heterozigótico XmnI_CT associado a heterozigotia para a mutação c.48G>A.

2.3 Grupo de doentes com drepanocitose

Foram analisados um total de 16 indivíduos de origem Africana com drepanocitose, com idades compreendidas entre 8 e 50 anos e níveis de HbF que variam entre 0,6% e 23,5%. Treze doentes são homozigóticos HbSS e três são heterozigóticos compostos para HbS e β -talassemia.

A Tabela XXV mostra a distribuição das frequências alélicas e genotípicas e o valor p do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para todos os polimorfismos estudados nos *loci* BCL11A, HMIP e HbG2 neste grupo populacional. O valor p HWE é superior a 0,05 em todos os SNPs, o que significa que não existem desvios significativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg neste grupo populacional.

Tabela XXV: Distribuição de frequências alélicas e genótípicas no grupo de indivíduos diagnosticados com drepanocitose (n=16).

Cr	Gene	SNP	Alelos	Genótipos	p HWE
2	BCL11A	rs11886868	C: 0,312 T: 0,688	CC: 0,000 (n=0) CT: 0,625 (n=10) TT: 0,375 (n=6)	0,233
2	BCL11A	rs766432	C: 0,281 A: 0,719	CC: 0,000 (n=0) CA: 0,562 (n=9) AA: 0,437 (n=7)	0,256
6	HMIP	rs9399137	C: 0,25 T: 0,75	CC: 0,062 (n=1) CT: 0,375 (n=6) TT: 0,562 (n=9)	1
6	HMIP	rs6934903	A: 0,066 T: 0,934	AA: 0,000 (n=0) AT: 0,142 (n=2) TT: 0,928 (n=13)	1
11	HbG2	rs7482144	T: 0,125 C: 0,875	TT: 0,062 (n=1) CT: 0,125 (n=2) CC: 0,812 (n=13)	0,190

p HWE: valor de p para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A distribuição dos níveis de HbF (log-transformados) de acordo com os genótipos de cada um dos SNPs dos *loci* BCL11A, HMIP e HbG2 são mostrados nos *box-plots* da Figura 20, tendo sido agrupados heterozigóticos e homozigóticos para o alelo derivado. Pela observação dos gráficos é possível observar níveis de HbF superiores no conjunto dos genótipos heterozigótico/homozigótico para os alelos derivados dos polimorfismos HMIP rs9399137 e HbG2 rs7482144. Para os restantes polimorfismos não se verificam diferenças na distribuição do nível de HbF entre os genótipos.

O teste *t*-Student de comparação de médias de HbF entre os dois conjuntos de genótipos não mostrou diferenças significativas para qualquer um dos polimorfismos (Tabela XXVI). No entanto, o conjunto dos indivíduos heterozigóticos e homozigóticos para os alelos derivados dos SNPs HMIP rs9399137_TC+CC e XmnI rs7482144_CT+TT, apresentam cerca de 1,9x e 2,3x, respetivamente, mais HbF do que os homozigóticos para os alelos ancestrais, o que mostra que estes SNPs se encontram moderadamente associados aos níveis de HbF.

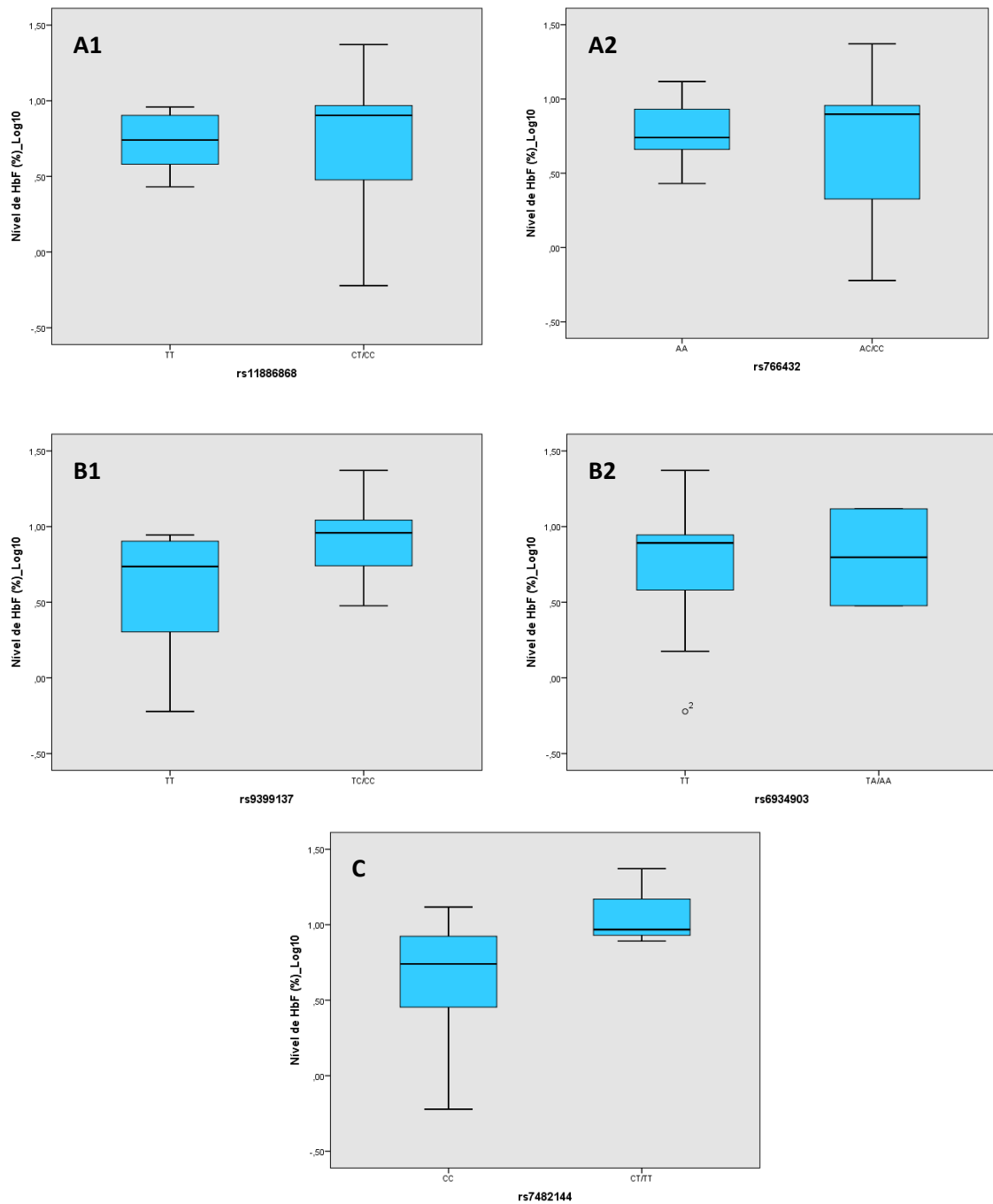


Figura 20: *Box-plots* mostrando a distribuição dos níveis de HbF (log-transformados) em doentes com drepanocitose para os genótipos de cada SNP (os indivíduos com os genótipos homocigóticos e heterocigóticos para o alelo derivado foram agrupados). **A1:** BCL11A rs11886868; **A2:** BCL11A rs766432; **B1:** HMIP rs9399137; **B2:** HMIP rs6934903; **C:** XmnI rs7482144.

Tabela XXVI: Média do nível de HbF nos diferentes genótipos para cada SNP e comparação das médias dos níveis de HbF (log-transformadas) entre os dois grupos de genótipos (grupo drepanocitose).

SNP		Genótipos HbF %		P (t-test)
BCL11A	rs11886868	TT (n=6)	TC+CC (n=10)	0,980
		5,767	8,400	
	rs766432	AA (n=7)	AC+CC (n=9)	0,643
		6,814	7,813	
HMIP	rs9399137	TT (n=9)	TC+CC (n=7)	0,094
		5,150	9,857	
	rs6934903	TT (n=13)	TA+AA (n=2)	0,813
		7,238	8,050	
HBG2	rs7482144	CC (n=13)	CT+TT (n=3)	0,079
		5,800	13,533	

n: número de indivíduos da amostra para cada genótipo.

Valores p marginalmente significativos a negrito.

Valores de HbF na Tabela não-transformados.

Nos testes de associação recorrendo a modelos de regressão linear (Tabela XXVII) também não foi possível observar valores significativos de associação à HbF para qualquer um dos SNPs estudados ($p > 0,05$).

Tabela XXVII: Resultados do teste de associação recorrendo ao modelo de regressão linear para os diferentes *loci* em indivíduos com drepanocitose.

Chr	Gene	SNP	Posição	N	MAF (alelo)	Beta	SE	Variância Explicada (%)	p
2	BCL11A	rs11886868	60720246	16	0,312 (C)	0,005	0,20	0,004%	0,979
2	BCL11A	rs766432	60719970	16	0,281(C)	-0,093	0,19	1,5%	0,643
6	HMIP	rs9399137	135419018	16	0,25(C)	0,276	0,14	20,9%	0,074
6	HMIP	rs6934903	135451564	15	0,066 (A)	0,075	0,31	0,4%	0,813
11	HBG2	rs7482144	5276169	16	0,125 (T)	0,241	0,16	13,3%	0,164

MAF: frequência do alelo *minor* (entre parêntesis);

N: número de amostras;

Beta: coeficiente de correlação;

SE: Erro padrão.

Valores de Beta e p são relativos ao alelo *minor*.

Para os dois polimorfismos do *locus* BCL11A rs11886868/rs766432, foram deduzidos três haplótipos (TA: 0,979; AC: 0,310; CC: 0,643), com um valor de desequilíbrio gamético $r^2=0,771$. Para os dois polimorfismos do *locus* HMIP rs9399137/rs6934903, foram deduzidos 3 haplótipos (com frequência superior a 1%)

(CA: 0,067; CT: 0,2; TT: 0,733), com um valor de desequilíbrio gamético $r^2=0,376$ (Tabela XXVIII).

O teste estatístico de associação com HbF mostrou valor significativo ($p=0,039$) para o haplótipo HMIP CT (rs9399137_C/rs6934903_T), com o alelo derivado rs9399137_C, e um coeficiente de correlação beta positivo (0,417), o que indica que o alelo derivado do SNP rs9399137 está positivamente associado aos níveis de HbF. O *locus* BCL11A não revela associação, aos níveis de HbF para qualquer dos haplótipos.

Tabela XXVIII: Frequências haplotípicas para os *loci* BCL11 e HMIP, valores r^2 de desequilíbrio gamético e testes de associação aos níveis de HbF (grupo β -talassémia intermédia).

		BCL11 rs11886868		LD r^2 rs868 rs432
		T	C	
BCL11 rs766432	A	0,687* $p=0,979$	0,031* $p=0,310$	0,771
	C		0,281* $p=0,643$	

		HMIP rs9399137		LD r^2 rs137 rs903
		T	C	
HMIP rs6934903	T	0,733* $p=0,083$	0,200* $p=0,039$	0,376
	A		0,067* $p=0,813$	

*Frequência dos haplótipos;
p, associação entre haplótipos e HbF;
LD, desequilíbrio gamético.

Os diversos estudos publicados em doentes com drepanocitose de várias populações de origem Africana têm vindo a mostrar que existe forte associação entre polimorfismos BCL11A e HMIP e os níveis de HbF (Lettre *et al.*, 2008; Creary *et al.* 2009; Makani *et al* 2011; Bhatnagar *et al.* 2011; Bae *et al.* 2012). Também relativamente ao polimorfismo XmnI, têm sido descritos valores significativos de associação aos níveis de HbF em doentes com drepanocitose (Labie *et al.* 1985; Pandey *et al.* 2012).

No nosso estudo não foi possível replicar estes valores significativos de associação aos níveis de HbF para os SNPs estudados. Foi possível verificar no entanto, através da análise haplotípica, que o polimorfismo HMIP rs9399137 com o alelo *minor*_C mostra associação ao aumento nível de HbF (haplótipo rs9399137_C/rs6934903_T) ($p=0,039$).

Assim, os resultados obtidos nos testes de associação, quer por regressão linear quer de comparação de médias (*t*-teste), podem ter sido condicionados pela baixa amostragem, uma vez que não foi possível replicar individualmente a associação do alelo *minor* do SNP rs9399137 aos níveis de HbF encontrada na análise haplotípica. Seria portanto necessária uma amostragem maior de doentes com drepanocitose para confirmar a associação deste polimorfismo aos níveis de HbF.

3. Estudo da deleção 3-pb no *locus* HMIP

No estudo da deleção de 3-pb no *locus* HMIP em todos os grupos de indivíduos, foi possível perceber que esta se encontra em desequilíbrio completo com o polimorfismo rs9399137. Através da genotipagem foi possível confirmar os resultados de Farrell *et al* (2011) e verificar que o alelo ancestral rs9399137_T se encontra em desequilíbrio completo com a inexistência da deleção (fragmento 207pb), e o alelo derivado rs9399137_A se encontra em desequilíbrio completo com a ocorrência da deleção (fragmento 276pb).

Assim, indivíduos homozigóticos rs9399137_TT mostram sempre ausência de deleção 3-pb e indivíduos homozigóticos AA mostram a presença da deleção em ambos os cromossomas. Para genótipos heterozigóticos TA ocorre a deleção apenas num dos cromossomas.

4. Distribuição de frequências alélicas em diferentes populações

Para comparar as frequências obtidas na população Portuguesa (valores obtidos para o grupo populacional de indivíduos saudáveis com HbF <2%) (n=45) com as previamente descritas para outras populações, recorreremos à base de dados Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). Verificamos que as frequências alélicas obtidas na população Portuguesa são semelhantes às obtidas para as populações Europeias, nomeadamente as populações de origem Norte/Oeste Europeu (CEU) e Espanha (IBS), exceto para os polimorfismos BCL11A que em Espanha estão descritos com frequências inferiores à Portuguesa (Tabela XXIX).

Tabela XXIX: Frequências alélicas (alelo derivado) para os diferentes SNPs em diferentes populações de origem Europeia e Africana e na amostra populacional de indivíduos normais (HbF <2%) da região centro de Portugal.

Gene	SNP	Alelo derivado	N/W EUR (CEU)	Espanha (IBS)	AFR Am (ASW)	RC Port
BCL11A	rs1188868	C	30	18	28	33,3
	rs766432	C	16	11	25	23,3
HMIP	rs9399137	C	22	25	9	21,1
	rs6934903	A	12	7	7	12,2
HBG2	rs7482144	T	26	36	6	30,0

N/W EUR (CEU): Indivíduos de origem Europeia (Norte/Oeste) (dados Ensembl).

IBS: subpopulação Ibérica de Espanha (dados Ensembl).

AFR (ASW): População Afro-americana residente no sudoeste dos EUA (dados Ensembl)

RC Port: População da região centro de Portugal (n=45) (este estudo).

Conclusão

Conclusão

Com o presente estudo foi possível concretizar os objetivos propostos, nomeadamente, i) calcular frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas para cada um dos SNPs nos diferentes grupos em estudo; ii) avaliar o grau de associação dos diversos polimorfismos nos *loci* BCL11A, HMIP e HBG2 aos níveis de HbF; e iii) comparar os resultados obtidos no presente trabalho com os obtidos e publicados em diferentes populações para os mesmos polimorfismos.

Foi possível replicar a associação aos níveis de HbF para alguns dos SNPs que têm vindo a ser recentemente objeto de estudos em diferentes populações para β -talassemia, drepanocitose e HPFH (Tabela XXX). Assim, pudemos confirmar uma forte associação dos SNPS BCL11A aos níveis de HbF no grupo populacional de indivíduos normais com HbF aumentada (HPFH). Também no grupo de doentes com β -talassemia minor foi possível verificar uma forte associação aos níveis de HbF do *locus* Xmn1, bem como do SNP rs766432 do *locus* BCL11A.

Para os doentes com β -talassemia intermédia e com drepanocitose não foi possível replicar associações aos níveis de HbF por parte dos SNPs analisados (Tabela XXX). Este resultado pode ficar a dever-se à pequena amostragem nestes dois grupos populacionais, apenas com 18 e 16 indivíduos, respetivamente. Neste sentido, seria importante conseguir um maior número de amostras, pelo menos para os casos de β -talassemia intermédia e drepanocitose, no sentido de se poder obter resultados mais consistentes.

Foi ainda possível confirmar que a deleção 3-pb HMIP se encontra em desequilíbrio completo com o polimorfismo rs9399137.

Tabela XXX: Síntese dos resultados de associação dos diferentes polimorfismos aos níveis de HbF nos diferentes grupos estudados, obtidos através de modelos de regressão linear implementados no programa PLINK.

Gene	SNPs	Normal/HPFH (n=60)	β -talassemia minor (n=42)	β -talassemia intermédia (n=18)	Drepanocitose (n=16)
BCL11A	rs1188868	$7,30 \times 10^{-5}$	0,221	0,072	0,979
	rs766432	0,002	0,001	0,625	0,643
HMIP	rs9399137	0,78	0,114	0,758	0,074
	rs6934903	0,69	0,082	0,203	0,813
HBG2	rs7482144	0,38	$2,26 \times 10^{-6}$	0,310	0,164

Valor p significativo: p < 0,05 (a negrito).

Referências

Mehta, A., Hoffbrand, V. (2009) – **Compêndio de Hematologia**. Lisboa : Instituto Piaget, ISBN : 978-989-659-012-3

Nelson, D.L., Cox, M.M. (2005) – **Lehninger principles of Biochemistry**, in Protein Function. 4th edition, New York : W. H. Freeman and Company, ISBN-13 :978-0-7167-4339-2. 157-189

Bae, H., Baldwin, C., Sebastiani, P., Telen, M. & Ashley-Koch, A. (2012) – Meta-analysis of 2040 sickle cell anemia patients: BCL11A and HBS1L-MYB are the major modifiers of HbF in African Americans. *Blood*, 120:1961.

Banan, M. (2013) – Hydroxyurea treatment in β -thalassemia patients: to respond or not respond? *Springer*, 92:289-299

Bhatnagar, P., Purvis, S., Barron-Casella, E., DeBaun, M., Casella, J., Arking, D. & Keefer, J. (2011) – Genome-wide association study identifies genetic variants influencing F-cell levels in sickle-cell patients. *Journal of Human Genetics*, 56:316-323.

Bloom, H., Beier, H. & Gross, H. (1987) - Improved silver-staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8:93-99.

Budowle, B.; Chakraborty, R.; Giusti, A.; Eisenberg, A. Allen, R. (1991) - Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high resolution PAGE. *American Journal of Human Genetics*, 48:137-144.

Creary, L., Ulug, P., Menzen, S., McKenzie, C.A., Hanchard, N.A., Taylor, V., Farrall, M., Forrester, T.E. & Thein, S. (2009) – Genetic variation on chromosome 6 influences F cell levels in healthy individuals of African descent and HbF levels in sickle cell patients . *PLoS ONE*, 4.

Dabke, Pooja, Colah, R., Ghosh, K. & Nadkarni, A. (2013) – Effect of cis acting potential regulators in the β globin *cluster* on the production of HbF in thalassemia patients. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 5.

Farrel, J., Sherva, R., Chen, Z., Luo, H., Chu, B., Ha, S., Li, C., Lee, A., Li, R., Li, C., Yuen, H., So, H., So, J., Ma, E., Chan, L., Chan, V., Sebastiani, P., Farrer, L., Baldwin, C., Steinberg, M. & Chui, D. (2011) – A 3-bp deletion in the HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23 is associated with HbF expression. *Blood*, 117:4935-4945.

Frenette, P. & Atweh, G. (2007) – Sickle cell disease : old discoveries, new concepts and future promise. *Journal of Clinical Investigation*, 117:850-858

Gilman, JG, & Huisman, THJ, (1985) – DNA sequence variation associated with elevated fetal $\epsilon\gamma$ globin production. *Blood*, 66:783-787

Green, N.S. & Barral, S. (2011) – Genetic modifiers of HbF and response to Hydroxyurea in sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*, 56:177-181.

Guida, Valentina (2006) - Influence of $\epsilon\gamma$ -158 C \rightarrow T and β - (AT) \times (T) γ globin gene polymorphisms on HbF levels in Italian β -thalassemia carriers and wild-type subjects. *Hematologica*, 91: 1275-1276.

John F. Jackson, M.D.; Janie L. Odom; Warren N. Bell, M.D. (1961) - Amelioration of Sickle Cell Disease by Persistent Fetal Hemoglobin. *JAMA*, 177:867-869

Jouini, L., Bibi, A., Ouali, F., Fredj, S.H., Ouennich, H.S., Messaoud, T. & Fattoum, S. (2011) – Contribution of β -globin *cluster* polymorphisms to raise fetal hemoglobin levels in normal adults. *Springer*, 39:4619-4625

Labie, D., Dunda-Belkhodja, O., Rouabhi, F., Pagnier, J., Ragusa, A. & Nagel, R. (1987) – The -158 site 5' to the $\epsilon\gamma$ gene and $\epsilon\gamma$ expression. *Blood*, 66:1463-1465.

Lette, G., Sankaran, V., Bezerra, M., Araújo, A., Uda, M., Sanna, S., Cao, A., Schlessinger, D., Costa, F. Hirschhorn, J. & Orkin, S. (2008) – DNA polymorphism at the BCL11A, HBS1L-MYB, and β -globin *loci* associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *PNAS* 105:11869-11874.

Luis, J.; Careiro. B. (1995) - Application of two STRs (VWA and TPO) to human population profiling: survey in Galicia. *Human biology*, 67:789-795.

Makani, J., Menzel, S., Nkya, S., Cox, S., Drasar, S., Soka, D., Komba, A., Mgaya, J., Rooks, H., Vassavda, N., Fegan, G., Newton, C., Farrall, M. & Thein, S. (2011) – Genetics of fetal hemoglobin in Tanzanian and British patients with sickle cell anemia. *Blood*, 117:1390-1392.

Menzel, S., Garner, C., Gut, I., Matsuda, F., Yamaguchi, M., Heath, S., Foglio, M., Zelenika, D., Boland, A., Rooks, H., Best, S., Spector, T., Farral, M., Lathrop, M. & Thein, S. (2007) – A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nature Genetics*, 39:1197 – 1199.

Neishabury, M., Zamani, S., Azarkeivan, A., Abedini, S., Darvish, H., Zamani, F. & Najmabadi, H. (2012) – The modifying effect of Xmn1-HBG2 on thalassemic phenotype is associated with its linked elements in the beta globin *locus* control region, including the palindromic site 5'HS4. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 48:1-5.

Nguyen, TKT, Joly, P, Bardel, C, Moulisma, M, Bonello-Palot, N, Francina, A, (2010) - The XmnI $\epsilon\gamma$ polymorphism influences hemoglobin F synthesis contrary to BCL11A and HBS1L-MYB SNPs in a cohort of 57 β -thalassemia intermedia patients. *Blood cells, Molecules, and Diseases*, 45:124-127

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. (2004) - PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 33:10-13.

Pandey, S., Pandey, S., Mishra, R. & Saxena, R. (2012) – Modulating effect of the -158 $\epsilon\gamma$ (C→T) Xmn1 polymorphism in Indian sickle cell patients. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 4.

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., Bakker, P., Daly, M. & Sham, P. (2007) - PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *The American Journal of Human Genetics*, 81:559-575.

Rees, D.C., Williams, T.N. & Gladwin, M.T. (2010) – Sickle-cell disease. *Lancet*, 376:2018-31

Rozen, S. & Skaletsky, H. - Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. **Humana Press**, Totowa, 2000, NJ, pp 365-386.

Sampietro, M., Thein, S., Contreras, M. & Pazmany, L. (1992) – Variation of HbF and F-cell number with the G-y XmnI (C-T) polymorphism in normal individuals. *Blood*, 79:832-839.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. (1977) - DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national Academy of Sciences USA*, 74: 5463-5467.

Sankaran, V., Menne, T., Xu, J., Akie, T., Lettre, G., Handel, B., Mikkola, H., Hirschhorn, J., Cantor, A. & Orkin, S. (2008) – Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *SCIENCE*, 322:1839-1842.

Sankaran, V.G. & Orkin, S.H. (2012) – The Switch from Fetal Adult Hemoglobin. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*

Shechter, A.N. (2008) – Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*, 10:3927-3938

Sutton, M., Bouhassira, E. & Nagel, R. (1989) - Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene *cluster* haplotypes. *American Journal of Hematology*, 32:66–69.

Tamagnini, G.P., Gonçalves, P., Ribeiro, M.L.S., Kaeda, J., Kutlar, F., Baysal, E., & Huisman, T.H.J. (1993) – β -thalassemia mutations in the Portuguese ; High frequencies of two alleles in restricted populations. *Hemoglobin* 17:31-40

Thein, S., Menzel, S., Lathrop, M. & Garner, C. (2009) – Control of fetal hemoglobin : new insights emerging from genomics and clinical implications. *Human Molecular Genetics*, 18:216-223

Thein, S., Menzel, S., Peng, X., Best, S., Jiang, J., Close, J., Silver, N., Gerovasilli, A., Ping, C., Yamaguchi, M., Wahlberg, K, Ulug, P., Spector, T., Garner, C., Matsuda, F., Farral, M. & Lathrop, M. (2007) – Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait *locus* on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. *PNAS*, 104 :11346-11351.

Uda, Manuela, Galanello, R., Sanna, S., Lettre, G., Sankaran, V., Chen, W., Usala, G., Busonero, F., Maschio, A., Albai, G., Piras, M., Sestu, N., Lai, S., Dei, M., Mulas, A., Crisponi, L., Naitza, S. Asunis, I., Deiana, M., Nagaraja, R., Perseu, L., Satta, S., Cipollina, M., Sollai, C., Moi, P., Hirschhorn, J., Orkin, S., Abecasis, G., Schlessinger, D., & Cao, A. (2008) – Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of phenotype of β - thalassemia. *PNAS*, 105:1620-1625.

Weatherall, D.J. (2001) – Phenotype - Genotype Relationships in monogenic disease : lessons from the thalassaemias. *Nature Reviews | Genetics*, 2:245-255

Base de dados Ensembl (busca ativa de SNPs) - Disponível na internet: <http://www.ensembl.org/index.html>; acessado a 19 de Abril de 2013.

Anexos

Anexo 1

Anexo 1.A - Individuo normal com nivel de HbF normal

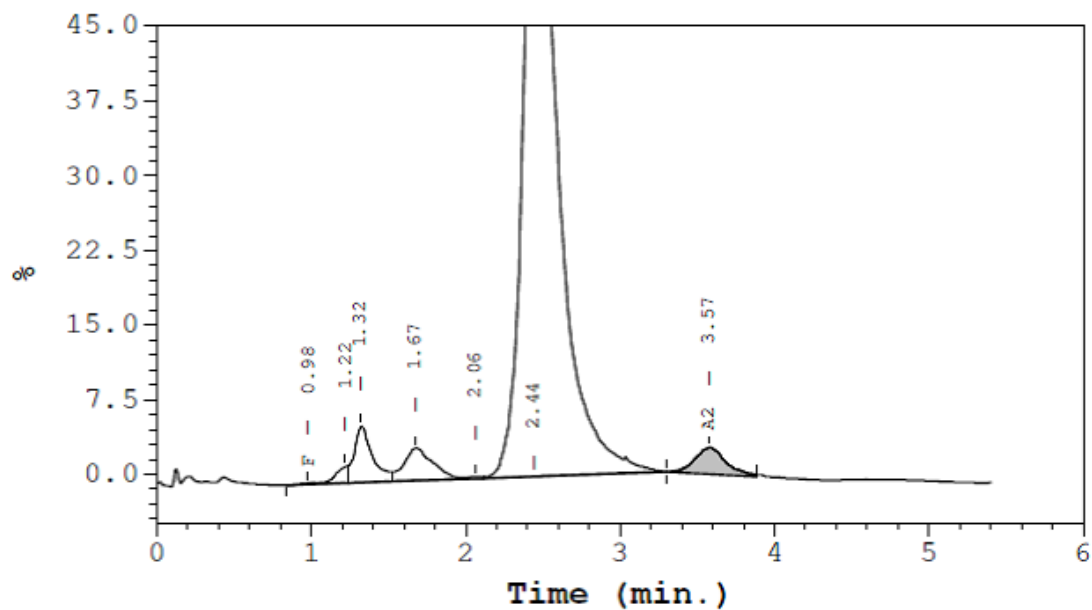
Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
F	0.1*	---	0.98	1258
Unknown	---	0.8	1.22	16056
P2	---	3.8	1.32	78817
P3	---	3.4	1.67	71221
Unknown	---	0.1	2.06	2450
Ao	---	88.9	2.44	1849008
A2	2.6	---	3.57	61149

F Concentration = 0.1* %

A2 Concentration = 2.6 %

*Values outside of expected ranges

Analysis comments:



Anexo 1.B - Indivíduo diagnosticado com β -talassemia *minor* com nível de HbF normal

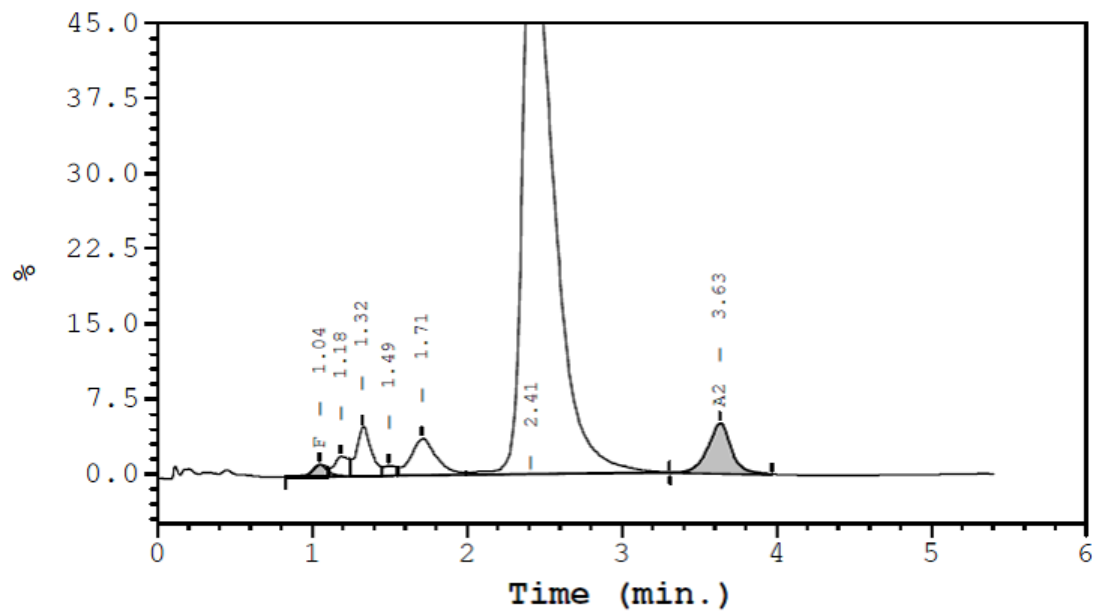
Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
F	0.9	---	1.04	18708
Unknown	---	1.4	1.18	29212
P2	---	3.4	1.32	73314
Unknown	---	0.6	1.49	12913
P3	---	4.4	1.71	94806
Ao	---	83.7	2.41	1786957
A2	5.0*	---	3.63	119727

F Concentration = 0.9 %

A2 Concentration = 5.0* %

*Values outside of expected ranges

Analysis comments:



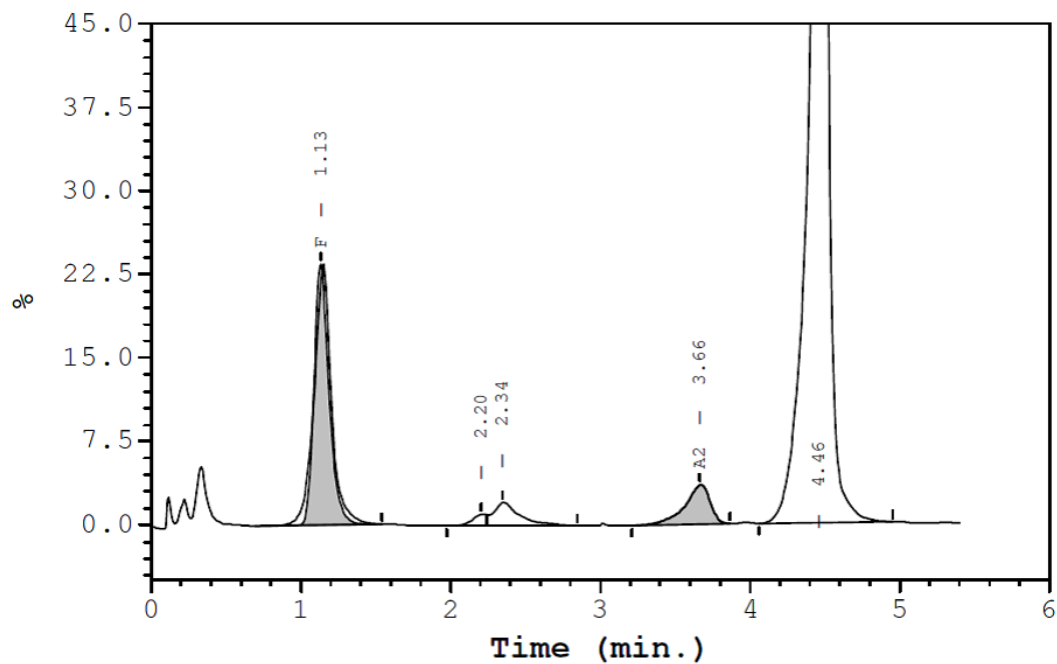
Anexo 1.C- Individuo diagnosticado com drepanocitose com nível de HbF aumentada

Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
F	15.9*	---	1.13	318512
Unknown	---	0.6	2.20	13361
Ao	---	2.3	2.34	47908
A2	3.5*	---	3.66	81811
S-window	---	78.2	4.46	1656330

F Concentration = 15.9* %
A2 Concentration = 3.5* %

*Values outside of expected ranges

Analysis comments:



Anexo 1.D- Individuo diagnosticado com β -talassemia intermedia com nível de HbF aumentada

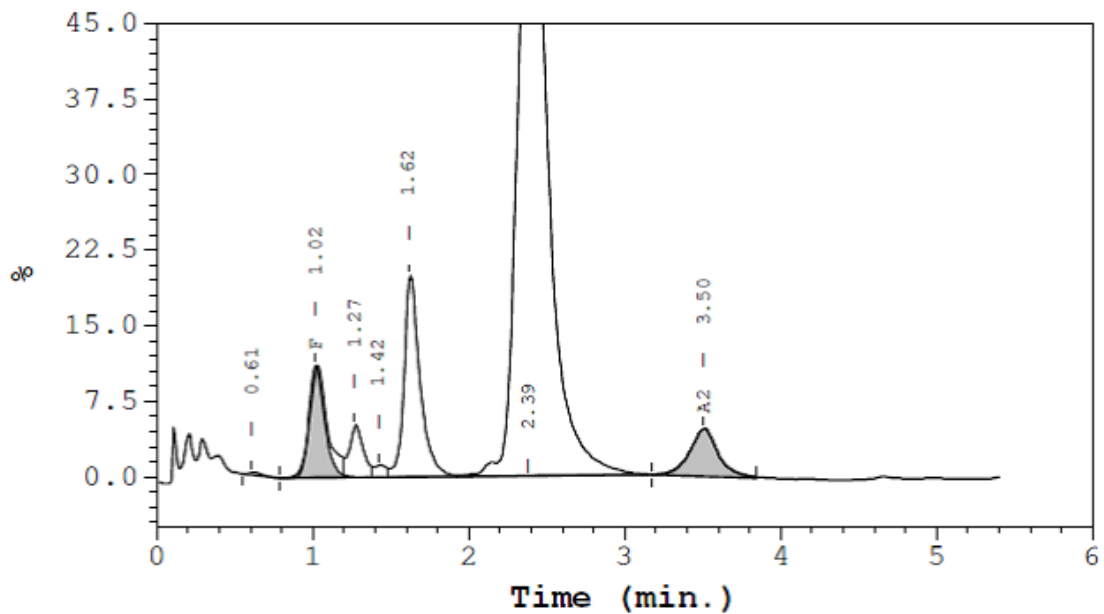
Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
Unknown	---	0.1	0.61	1895
F	6.4*	---	1.02	97664
P2	---	2.6	1.27	40828
Unknown	---	0.5	1.42	8265
P3	---	11.6	1.62	178547
Ao	---	74.0	2.39	1143701
A2	4.7*	---	3.50	74582

F Concentration = 6.4* %

A2 Concentration = 4.7* %

*Values outside of expected ranges

Analysis comments:



Anexo 2

Protocolo de extração de DNA com o kit Favorgen

Passo 1 – Lise

1. Preparar tubos de 1,5ml com 600µl de RBC lysis buffer
2. Adicionar 200µl de sangue
3. Misturar agitando ligeiramente a mistura e centrifugar 5 minutos a 10 000rpm
4. Eliminar o sobrenadante
5. Adicionar 200µl de FABG buffer e 20µl de proteinase K
6. Vortex (5 a 10 segundos), para homogeneizar pellet. Colocar na estufa a 56°C durante 1h, se possível em agitação

Passo 2 – Binding

1. Preparar Elution buffer a 70°C, para passo a frente
2. Adicionar 200µl de etanol (96-100%). Vortex 10 segundos.
3. Colocar coluna FABG em tubo de 2ml, e transferir a mistura para a coluna. Centrifugar 5min a 12000rpm. Esvaziar tubo e recolocar coluna.

Passo 3 – Lavagem

1. Adicionar 400µl de W1 buffer. Centrifugar 1min a 12000rpm. Esvaziar tubo e recolocar coluna.
2. Adicionar 600µl de wash buffer. Centrifugar 1min a 12000rpm. Esvaziar tubo e recolocar coluna.
3. Centrifugar a 12000rpm durante 3min

Passo 4 – Eluição

1. Transferir coluna FABG para tubo coletor de 1,5ml.
2. Adicionar 50µl de Elution Buffer (70°C) para recolha de DNA.
3. Centrifugar 1min a 12000rpm
4. Guardar tubos coletores, com DNA, a 4°C ou -10°C

Anexo 3

Visualização das bandas em géis de poliacrilamida após digestão com enzimas de restrição

De acordo com Budowle al., 1991

1. Etanol 10%, em agitação durante 10 min;
2. Ácido nítrico 1%, em agitação durante 5 min;
3. Água destilada, duas vezes durante 30 s;
4. Nitrato de prata 0,2%, em agitação durante 20 min;
5. Água destilada, duas vezes durante 30 s;
6. Carbonato de sódio 3% (100ml) e formaldeído 37% (20 μ l), em agitação durante 2 à 5 min;
7. Repetir passo 6 duas vezes.
8. Ácido acético 10%, durante 30 s (paragem da reação);
9. Lavagem com água destilada.

Anexo 4

Visualização das bandas na técnica de SSCP

De acordo com Bloom *et al.*, 1987

1. Ácido acético 10%, em agitação durante 20 min;
2. Água destilada, duas vezes, durante 2 min;
3. Nitrato de prata 0,1% (100ml) e formaldeído 37% (150 μ l), em agitação durante 30 min;
4. Água destilada, durante 30 s;
5. Carbonato de sódio 3% (100ml) + formaldeído 37% (150 μ l) + tiosulfato de sódio 10% (20 μ l), em agitação durante 2 a 5 min;
6. Repetir passo 5.
7. Ácido acético 10%, durante 30s (paragem da reação);
8. Lavagem com água destilada.