

## **ÍNDICE**

ÍNDICE .....	i
ÍNDICE DAS FIGURAS .....	iv
ÍNDICE DAS TABELAS .....	xi
AGRADECIMENTOS .....	xiv
ABREVIATURAS .....	xvi
RESUMO .....	xx
ABSTRACT .....	xxii
PALAVRAS-CHAVE .....	xxiv
INTRODUÇÃO .....	2
1. Hemoglobina .....	3
1.1. Hb A .....	6
1.2. Função da Hemoglobina .....	9
2. Hemoglobinopatias .....	12
2.1. Variantes de Hemoglobina .....	13
2.1.1. Hemoglobina instável .....	15
2.1.2. Hemoglobinas com afinidade para o oxigénio alterada .....	16
2.1.2.1. Hemoglobinas com alta afinidade para o oxigénio .....	17
2.1.2.2. Hemoglobinas com baixa afinidade para o oxigénio .....	17
2.1.3. Hemoglobina S .....	18
2.1.4. Variantes talassémicas .....	20
2.1.5. Hemoglobina M .....	21
2.2. Talassémias .....	22
2.2.1. Talassémia beta .....	23
OBJECTIVOS .....	26
MÉTODOS e MATERIAIS .....	28
RESULTADOS .....	48
DISCUSSÃO .....	92
1. Variantes descritas .....	93
1.1. Indivíduo 1 - Hb Köln .....	93
1.2. Indivíduo 2 - Hb Leiden .....	95
1.3. Indivívuo 3 - Hb Saint Louis .....	96
1.4. Indivíduo 4 - Hb Shepherds Bush .....	98
1.5. Indivíduo 5 - Hb Malmö .....	100
1.6. Indivíduo 6 - Hb Vila Real .....	102
1.7. Indivíduo 7 - Hb San Diego .....	103
1.8. Indivíduos 8 e 9 - Hb S .....	105

1.9.	Indivíduo 10 - Hb C .....	111
1.10.	Indivíduo 11 - Hb D-Punjab.....	113
1.11.	Indivíduo 12 - Hb E.....	114
1.12.	Indivíduo 13 - Hb Lepore-Washington-Boston.....	118
1.13.	Indivíduo 14 - Hb N-Baltimore .....	120
1.14.	Indivíduo 15 - Hb Aix les Bains.....	121
2.	Variantes não descritas.....	123
2.1.	Indivíduos 16 e 17 - Hb CD 142 GCC>TTC .....	123
2.2.	Hb Ponta Delgada.....	127
	CONCLUSÃO .....	132
	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	134
	NOTA FINAL.....	136
	ANEXOS.....	138
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	145

## **ÍNDICE DAS FIGURAS**

Figura 1 – Representação do heterotetrâmero da Hb humana e do grupo heme. A – A estrutura da hemoglobina é composta por duas subunidades  $\alpha$  (rosa) e duas  $\beta$  (amarelo). A molécula contém quatro grupos heme (a preto com o átomo de ferro a lilás). B – A ferro-protoporfirina com o ião ferro no estado ferroso que está ligado ao azoto (N) de cada uma das histidinas (Berg, Tymoczko, & Stryer, n.d.)..... 3

Figura 2 – Organização básica do gene globínico  $\beta$ . A localização do cluster do gene globínico  $\beta$  [5'- $\epsilon$ -(13.3 kb)- $\gamma^G$ -(3.5 kb)- $\gamma^A$ -(13.9kb)- $\delta$ -(5.4 kb)- $\beta$ -3'] é numa zona próxima do telómero do braço curto do cromossoma 11 como mostrado em baixo. Os genes estão representados como caixas no meio da segunda linha, nomeados de acordo com o polipeptídeo globínico que é codificado. A orientação da transcrição 5'-3' é da esquerda para a direita (Provan & Gribben, 2010). A ordem do gene reflete os tempos de expressão durante o desenvolvimento eritróide (Leach et al., 2001)..... 4

Figura 3 – Molécula de Hb A. A Hb A é composta por duas cadeias  $\alpha$  e duas  $\beta$ , que estão associadas em dois dímeros idênticos  $\alpha_1\beta_1$  ou  $\alpha_2\beta_2$ . Os contactos de empacotamento ( $\alpha_1\beta_1$  ou  $\alpha_2\beta_2$ ) envolvem as hélices B, G, e H, e o “corner” GH. Os contactos de deslizamento ( $\alpha_1\beta_2$  ou  $\alpha_2\beta_1$ ), que sofrem as mudanças principais quando o estado do heme é modificado, envolvem principalmente as hélices C e G e o “corner” FG. (a) Vista frontal mostra o tetrâmero da Hb A e os três eixos de simetria. A linha vertical (marcada por uma elipse sólida) marca o eixo de simetria duplo (a baixo deste eixo, é possível ver a primeira cavidade central constituída pelas cadeias  $\beta$ ). As elipses e as linhas a tracejado marcam os dois pseudoeixos de simetria, uma vez que a simetria é apenas aproximada. Os números a negrito representam os resíduos em contacto directo entre as cadeias  $\alpha_1$  e  $\beta_2$ . O dímero  $\alpha_1\beta_2$  (verde) nunca se dissocia e interage com o dímero  $\alpha_2\beta_1$  (tonalidade clara) para alterar a conformação de T para R. Alterações nesta área podem produzir Hbs com alta ou baixa afinidade. (b) A vista lateral do tetrâmero mostra o dímero estável, o qual se move ou dissocia (Provan & Gribben, 2010) (H Wajcman & Galactéros, 1996). ..... 6

Figura 4 – Representação do gene globínico  $\beta$  humano. Os exões estão representados por retângulos riscados e constituem a porção codificante do gene. Os segmentos de intervenção (intrões) estão representados pelas áreas a cinzento (Bunn, 1981). ..... 9

Figura 5 – Curva de dissociação hemoglobina-oxigénio. Quando o  $P_{50}$  está abaixo do normal (a curva é desviada para a esquerda), a afinidade da Hb para o  $O_2$  aumenta. Um aumento do  $P_{50}$  (deslocamento da curva para a direita) diminui a afinidade da Hb para o  $O_2$  e melhora a libertação eficaz de oxigénio (Martin H. Steinberg, Forget, Higgs, & Weatherall, 2009)..... 10

Figura 6 - Mobilidades electroforéticas de Hbs em IEF. .... 33

Figura 7 – Mobilidades electroforéticas de Hbs na electroforese em acetato de celulose. .... 34

Figura 8 - Mobilidades electroforéticas das cadeias globínicas por AUT-PAGE..... 35

Figura 9 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.295G> A; pVal99Met (Hb Köln). (A) Resíduo original (Valina); (B) Residuo mutante (Metionina).....	50
Figura 10 - Sequência de DNA de um fragmento do exão 1 de HBB mostrando a mutação c.22_24delGAG; pGlu6/7Stop .....	50
Figura 11 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.86T> A; pLeu29Gln (Hb Saint Louis). (A) Resíduo original (Leucina); (B) Residuo mutante (Glutamina).....	51
Figura 12 - HPLC de uma amostra de sangue do indivíduo 4. No gráfico é perceptível a visualização de quatro eluições de Hbs referentes a Hb F, Hb X, Hb A <sub>0</sub> e Hb A <sub>2</sub> .....	52
Figura 13 - IEF de um hemolisado do indivíduo 4. A parte superior corresponde à amostra do indivíduo 4, a inferior é um controlo normal. ....	53
Figura 14 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.224G> A; pGly75Asp (Hb Shepherds Bush). (A) Resíduo original (Glicina); (B) Residuo mutante (Ácido Aspártico). ....	54
Figura 15 - IEF do indivíduo 5. A parte superior corresponde à amostra do indivíduo 5 e a parte superior a uma amostra controlo normal. ....	55
Figura 16 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c. [294C> A ou 294C>G]; pHis98Gln (Hb Malmö). (A) Resíduo original (Histidina); (B) Residuo mutante (Glutamina). 55	55
Figura 17 - HPLC de uma amostra de sangue do indivíduo 6. No gráfico é perceptível a visualização de três eluições de Hbs referentes a Hb X, Hb A <sub>0</sub> e Hb A <sub>2</sub> . ....	56
Figura 18 - IEF de um hemolisado do individuo 6. A parte superior corresponde à amostra do indivíduo 6 e a parte inferior a uma amostra controlo normal. ....	57
Figura 19 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.110C> A; pPro37His (Hb Vila Real). (A) Resíduo original (Prolina); (B) Residuo mutante (Histidina). ....	58
Figura 20 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.328G>A; pVal110Met (Hb San Diego). ....	59
Figura 21 - HPLC de uma amostra de sangue do individuo 8. No gráfico é perceptível a visualização de três eluições de Hbs referentes a Hb A <sub>0</sub> e Hb A <sub>2</sub> , e Hb S. ....	60
Figura 22 - IEF de um hemolisado do indivíduo 8. A parte inferior corresponde à amostra do indivíduo 8 e a parte superior a uma amostra controlo normal. ....	60

Figura 23 - Sequência de DNA de um fragmento do exão 1 de HBB mostrando a mutação c.20A> T; pGlu7Val, em heterozigotia.....	61
Figura 24 - HPLC de uma amostra de sangue do indivíduo 9. No gráfico é perceptível a visualização de quatro eluições de Hbs referentes a Hb F, Hb A <sub>0</sub> e Hb A <sub>2</sub> e Hb S.....	62
Figura 25 - IEF de um hemolisado do indivíduo 9. A parte superior corresponde à amostra do indivíduo 9 e a parte inferior a uma amostra controle normal. ....	63
Figura 26 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.110C> A; pPro37His (Hb S). (A) Resíduo original (Glutamato); (B) Resíduo mutante (Valina). ....	64
Figura 27 - HPLC de uma amostra de sangue do indivíduo 10. No gráfico é perceptível a visualização de três eluições de Hbs referentes a Hb A <sub>0</sub> , Hb A <sub>2</sub> , e Hb C. ....	65
Figura 28 - IEF de um hemolisado do indivíduo 10. A parte superior corresponde à amostra do indivíduo 10 e a parte inferior a uma amostra controle normal. ....	65
Figura 29 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.19G> A; pGlu7Lys (Hb C). (A) Resíduo original (Glutamato); (B) Resíduo mutante (Lisina). ....	66
Figura 30 - HPLC de uma amostra de sangue do indivíduo 11. No gráfico é perceptível a visualização de três eluições de Hbs referentes a Hb A <sub>0</sub> , Hb A <sub>2</sub> , e Hb D-Punjab.....	67
Figura 31 - IEF de um hemolisado do indivíduo 11. A parte inferior corresponde à amostra do indivíduo 11 e a parte superior a uma amostra controle normal. ....	67
Figura 32 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.364G>C; pGlu122Gln (Hb D-Punjab). (A) Resíduo original (Glutamato); (B) Resíduo mutante (Glutamina).....	69
Figura 33 - HPLC de uma amostra de sangue do indivíduo 12. No gráfico é perceptível a visualização de duas eluições de Hbs referentes a Hb A <sub>0</sub> e Hb A <sub>2</sub> . ....	70
Figura 34 - Sequência de DNA de um fragmento do exão 1 de HBB mostrando a mutação c.79G> A; pGlu27Lys, em heterozigotia. ....	70
Figura 35 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.79G> A; pGlu27Lys (Hb E). (A) Resíduo original (Glutamato); (B) Resíduo mutante (Lisina).....	71
Figura 36 - HPLC de uma amostra de sangue do indivíduo 13. No gráfico é perceptível a visualização de cinco eluições de Hbs referentes a Hb F, Hb X, Hb A <sub>0</sub> e Hb A <sub>2</sub> . ....	72

Figura 37 - IEF de um hemolisado do indivíduo 13. A parte superior corresponde à amostra do indivíduo 13 e a parte inferior a uma amostra controlo normal. ....	72
Figura 38 - HPLC de uma amostra de sangue do indivíduo 14. No gráfico é perceptível a visualização de três eluições de Hbs referentes a Hb X, Hb A <sub>0</sub> e Hb A <sub>2</sub> . ....	74
Figura 39 - IEF de um hemolisado do indivíduo 14. A parte de superior é referente a uma amostra controlo e a parte inferior corresponde à amostra do indivíduo 14, onde é possível visualizar duas bandas. Estas bandas correspondiam à Hb A e a uma variante de Hb. ....	74
Figura 40 - Sequência de DNA de um fragmento do exão 2 de HBB mostrando a mutação c.286A> G; pLys96Glu, de acordo com HGVD, em heterozigotia. ....	75
Figura 41 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.286A> G; pLys96Glu (Hb N-Baltimore). (A) Resíduo original (Lisina); (B) Residuo mutante (Glutamato).....	76
Figura 42 - HPLC de uma amostra de sangue indivíduo 15. No gráfico é perceptível a visualização de duas eluições de Hbs referentes a Hb A <sub>0</sub> e Hb A <sub>2</sub> . ....	77
Figura 43 - IEF de um hemolisado do indivíduo 15. A parte inferior corresponde à amostra do indivíduo 15 e a parte superior a uma amostra controlo normal. ....	77
Figura 44 - Electroforese de acetato de celulose de uma amostra de sangue do indivíduo 15. A parte inferior corresponde à amostra do indivíduo 15 e a parte superior a uma amostra controlo normal. ....	78
Figura 45 – HPLC de fase reversa das globinas de uma amostra de sangue do indivíduo 15. ...	78
Figura 46 - AUT-PAGE das cadeias globínicas do hemolisado do indivíduo 15. A parte superior corresponde ao hemolisado do indivíduo 15 e a parte inferior a uma amostra controlo normal. ....	78
Figura 47 - Afinidade para o oxigénio (logp <sub>50</sub> ) de um hemolisado normal (losango azuis) e variante Hb Aix-les-Bains (quadrado vermelho). Condições experimentais: tampão 0.1 M Bis-Tris ou Tris/HCl + 0.1 M NaCl, na ausência (símbolos preenchidos) e na presença de 2,3-DPG, a 37°C.....	79
Figura 48 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.17C> T; pPro5Leu (Hb Hb Aix-les-Bains). (A) Resíduo original (Prolina); (B) Residuo mutante (Leucina). ....	80
Figura 49 - HPLC das Hbs de uma amostra de sangue do indivíduo 16. No gráfico é perceptível a visualização de três eluições de Hbs referentes a Hb X, Hb A <sub>0</sub> e Hb A <sub>2</sub> .....	81
Figura 50 - IEF das Hbs de um hemolisado do indivíduo 16. A parte inferior corresponde à amostra do indivíduo 16 e a parte superior a uma amostra controlo múltiplo. ....	81

Figura 51 - HPLC das Hbs de uma amostra de sangue do indivíduo 17. No gráfico é perceptível a visualização de quatro eluições de Hbs referentes a Hb F, Hb X, Hb A <sub>0</sub> e Hb A <sub>2</sub> .....	82
Figura 52 - IEF das Hbs de um hemolisado do indivíduo 17. A parte superior corresponde à amostra do indivíduo 17 e a parte inferior a uma amostra controle múltiplo. ....	82
Figura 53 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação [(c.427G> C; c.428C>T) pAla143Phe. (A) Resíduo original (Alanina); (B) Resíduo mutante (Fenilalanina).....	84
Figura 54 - Captação da região de interesse da mutação depois de 100 nanosegundos. A - O resíduo Ala β142 está perto da Tyr β145 que tem um hidrogênio ligado a Val β98, um hidrogênio deste último resíduo está à histidina proximal. B - O resíduo Phe β142 não perturbam em 100 nanosegundos a ligação de hidrogênio envolvendo Tyr β145, Val 98 e a histidina proximal.....	84
Figura 55 - Distribuição de probabilidade do ângulo de torção CA-CB-CG-ND da histidina proximal da subunidade β obtido durante simulações de 100 nanosegundos. O valor é ligeiramente perturbado pela mutação CD142 Ala→Phe. A linha colorida a preto corresponde à Hb A e a linha colorida a vermelho corresponde à Hb com a mutação CD142 Ala→Phe. ....	85
Figura 56 - HPLC das Hbs de uma amostra de sangue do indivíduo 18. No gráfico é perceptível a visualização de três eluições de Hbs referentes a Hb X, Hb A <sub>0</sub> e Hb A <sub>2</sub> .....	87
Figura 57 - IEF das Hbs de um hemolisado do indivíduo 18. A parte superior corresponde à amostra do propósito e a inferior a um controle normal. Na amostra do propósito é possível visualizar duas bandas uma referente à Hb A e outra a uma variante de Hb. ....	87
Figura 58 - Electroforese em acetato de celulose de uma amostra de sangue do indivíduo 18. A parte superior corresponde à amostra do indivíduo 18 e a parte inferior a uma amostra controle normal. ....	87
Figura 59 – SDS do tetrâmero de um hemolisado do indivíduo 18. A parte superior corresponde à amostra do indivíduo 18 e a parte inferior a uma amostra controle normal.....	88
Figura 60 - HPLC de fase reversa de uma amostra de sangue do indivíduo 18. É possível verificar a eluição do heme, cadeia globínica α e β normais.....	88
Figura 61 - AUT-PAGE das cadeias globínicas do hemolisado do indivíduo 18. A parte inferior corresponde à amostra do indivíduo 18 e a parte superior a uma amostra controle normal. É possível visualizar no poço referente à amostra do indivíduo, a migração de três cadeias globínicas: uma α e β normais e uma β anormal.....	88
Figura 62 - Sequência de DNA de uma parte do exão 2 mostrando a inserção de 33 pb.....	89

Figura 63 - Efeito do pH na afinidade do oxigénio ( $\log p_{50}$ ) e cooperatividade ( $n_{50}$ ) de hemolisados normais (símbolos abertos) e da variante Hb Ponta Delgada (símbolos fechados). Condições experimentais: tampão 100 mM Bis-Tris ou Tris/HCl + 100 mM NaCl, na ausência de 2,3 DPG, a 37°C..... 89

Figura 64 – Efeito do pH na afinidade ao oxigénio ( $\log p_{50}$ ) e cooperatividade ( $n_{50}$ ) de hemolisados normais (símbolos abertos) e da variante Hb ponta Delgada (símbolos fechados). Condições experimentais: tampão 100 mM Bis-Tris ou Tris/HCl + 100 mM NaCl, na presença de 2,3-DPG, a 37°C..... 90

Figura 65 – Modelo Tarzan: mecanismo proposto para a formação de inserções e deleções. A replicação pela DNA polimerase normal (pequeno aglomerado de círculos) é bloqueada por um aducto largo de DNA (preto oval) no DNA molde (A). Para evitar o desvio do aducto, são recrutadas uma polimerase lesionada sujeita a erros (aglomerado largo de círculos) e uma helicase (triângulo). A polimerase lesionada é também bloqueada pelo aducto mas a helicase dissocia a nova cadeia da molde (B), permitindo à polimerase lesionada sintetizar alguns nucleótidos a partir do molde (C1) ou da nova cadeia (C2). Alguns nucleótidos adicionais são sintetizadas, às vezes com erros (X), gerando a sequência inserida da microindel (linha a tracejado). Assim, a sequência inserida é ou uma cópia sense (no caso C1) ou antisense (no caso C2), por vezes com erros, de sequências vizinhas. A helicase depois dissocia o segmento sintetizado pela polimerase lesionada a partir da cadeia molde (no caso C1) ou da nova (no caso C2). Com o tamanho adicional do DNA sintetizado, a polimerase translesion é capaz de passar pelo aducto e preversar a célula. Este processo resulta em ignorar alguns nucleótidos no molde (D, linha grossa tracejada) resultando na parte microdeleção da microindel. Algumas das bases ignoradas (ou os seus complementos na nova cadeia no caso C2) podiam ter sido parte do molde para a sequência inserida em que caso exista sobreposição das sequências inserida e delectada da microindel. Depois o aducto é contornado, a polimerase normal pode continuar com a replicação (E) (Scaringe et al., 2008)..... 131

## **ÍNDICE DAS TABELAS**

Tabela 1 - Valores hematológicos normais de mulheres (>12 anos).....	31
Tabela 2 – Valores hematológicos normais de homens (>12 anos).....	31
Tabela 3 – Janelas designadas para Bio-Rad Variant II HPLC system.....	32
Tabela 4 – Valores normais de Hbs no HPLC. ....	32
Tabela 5 - Resumo das sequências dos primers utilizados para a amplificação do gene $\beta$ . ....	39
Tabela 6 - Condições térmicas de amplificação do gene $\beta$ -globínico. ....	39
Tabela 7 - Resumo das sequências dos primers utilizados para a amplificação do gene $\beta$ . ....	40
Tabela 8 - Condições térmicas de amplificação do gene $\beta$ -globínico. ....	40
Tabela 9 - Condições térmicas de purificação do produto de PCR.....	41
Tabela 10 - Condições térmicas de sequenciação do produto de PCR purificado. ....	41
Tabela 11 - Condições térmicas de da linearização de RNA. ....	42
Tabela 12 - Condições térmicas de reação de transcriptase reversa. ....	43
Tabela 13 - Parâmetros do estudo das Hbs do indivíduo 4. ....	53
Tabela 14 - Parâmetros do estudo das Hbs do indivíduo 6. ....	57
Tabela 15 - Parâmetros do estudo das Hbs do indivíduo 7. ....	58
Tabela 16 - Parâmetros hematológicos e moleculares do indivíduo 8. ....	61
Tabela 17 - Parâmetros hematológicos e moleculares do indivíduo 9. ....	63
Tabela 18 - Parâmetros do estudo das Hbs do indivíduo 10. ....	65
Tabela 19 - Parâmetros hematológicos e moleculares do indivíduo 11. ....	68
Tabela 20 - Parâmetros do estudo das Hbs do indivíduo 12. ....	70
Tabela 21 - Parâmetros hematológicos e moleculares do indivíduo 13. ....	73
Tabela 22 - Parâmetros do estudo das Hbs do indivíduo 14. ....	75

Tabela 23 - Parâmetros do estudo das Hbs do indivíduo com Hb Aix-les-Bains. ....	79
Tabela 24 - Parâmetros hematológicos e moleculares dos indivíduos com 16 e 17. ....	83
Tabela 25 - Parâmetros hematológicos e moleculares do indivíduo 18. ....	91
Tabela 26 – Exemplos de variantes de Hb com a mutação correspondente à Hb S e outra substituição de aminoácido na cadeia globínica $\beta$ (Zanella-Cleon et al., 2009). ....	110

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Celeste Bento, que me ensinou o caminho das hemoglobinas, pela confiança e orientação. Ao Dr. Ângelo Tomé pela sua disponibilidade e incentivo.

Ao Dr. Armando Cristóvão e ao Dr. António Portugal por me avaliarem e serem parte do júri da defesa deste trabalho.

Ao Dr. Renzo Galanello e à Dra. Marcella Corda pela aceitação e disponibilidade oferecida. À Dra. Carla Sollaino, Dra. Benedetta Era e Dra. Antonella Fais pelos conhecimentos, confiança, amizade e força.

À Mariline Gameiro pela paciência, apoio, amizade e pela interajuda. Aos meus amigos pelo apoio, amizade, pelos bons momentos passados em conjunto, pelas conversas apaziguadoras em momentos mais difíceis.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização do presente trabalho.

Com muito amor, dedico esta dissertação aos meus queridos pais, que me passaram todos os princípios de valor, o sentido de responsabilidade, a vontade de trabalhar e de dar o meu melhor. Agradeço-vos do fundo do meu coração, também pelo carinho, incentivo e apoio em todos os momentos... Muito obrigada. Dedico também às minhas irmãs, que estão constantemente a dar-me força, carinho e a serem quem são para mim, e aos meus avós pelo apoio incondicional.

## **ABREVIATURAS**

2,3-difosfoglicerato	2,3-DPG
Absorvância	A
Acetic acid-Urea-Triton polyacrylamide gel	AUT-PAGE
Ácido Aspártico	Asp
Ácido desoxirribonucleico	DNA
Ácido desoxirribonucleico complementar	cDNA
Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético	EDTA
Ácido glutâmico	Glu
Ácido ribonucleico	RNA
Ácido ribonucleico mensageiro	mRNA
Adenina	A
Água destilada	dH <sub>2</sub> O
Alanina	Ala
Alfa	$\alpha$
Arginina	Arg
Armstrong	Å
Asparagina	Asn
Aspartato	Asp
Azoto	N
Beta	$\beta$
Citosina	C
Cloreto de sódio	NaCl
Codão	CD
Coefficiente de absorção	$\lambda$
Concentração	c
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média	CHGM
Cromatografia líquida de alta resolução	HPLC
Delta	$\delta$
Desoxirribonucleósidos trifosfatados	dNTP
Didesoxinucleósidos trifosfatados	ddNTP
Dióxido de carbono	CO <sub>2</sub>
Epsilon	$\epsilon$
Estado relaxado	Estado R
Estado tenso	Estado T
Fenilalanina	Phe
Ferro	Fe
Focagem isoelétrica	IEF
Gama	$\gamma$
Gene globínico Agama	HBG1
Gene globínico alfa	HBA
Gene globínico beta	HBB
Gene globínico delta	HBD
Gene globínico epsilon	HBE
Gene globínico Ggama	HBG2

Gene globínico teta	HBQ
Gene globínico zeta	HBZ
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	GAPDH
Glicina	Gly
Glutamina	Gln
Graus celsius	°C
Guanina	G
Hematócrito	HTC
Hemoglobina	Hb
Hemoglobina	HGB
Hemoglobina desoxigenada	desoxi-Hb
Hemoglobina globular média	HGM
Hemoglobina oxigenada	Oxi-Hb
Hidróxido de sódio	NaOH
Histidina	His
Largura	l
Leucina	Leu
Lisina	Lys
Locais hipersensíveis à acção da enzima DNase I	HS
Metionina	Met
Micrograma	µg
Microlitro	µL
Miliampere	mA
Miligrama	mg
Mililitro	mL
Milimolar	mM
Minuto	min
Molar	M
Monóxido de azoto	NO
Monóxido de carbono	CO
Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification	MLPA
Nanograma	ng
Nanometros	nm
Nanomolar	nM
Nucleótido	nt
Oxigénio	O <sub>2</sub>
Pares de base	pb
Ponto de saturação de 50%	p50
Prolina	Pro
QuiloBase	kb
QuiloDaltons	kDa
Reacção de polimerização em cadeia (Polymerase Chain Reaction)	PCR
Região de controlo de locus (Locus Control Region)	LCR

Rotações por minuto	rpm
Segundo	s
Sequência de intervenção	IVS
Serina	Ser
Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	SDS-PAGE
Teta	$\theta$
Timina	T
Tirosina	Tyr
Treonina	Thr
Valina	Val
Volt	V
Volume globular médio	VGM
Zeta	$\zeta$

## **RESUMO**

A hemoglobina é a proteína do sangue responsável pelo transporte de oxigénio dos capilares alveolares até aos tecidos. Esta molécula consiste em quatro cadeias globínicas, duas cadeias do tipo alfa e duas do tipo beta, que estão ligadas ao heme, uma ferro-porfirina. As cadeias globínicas são codificadas nos agrupamentos génicos alfa e beta globina, localizados no cromossoma 16 (16p13.3) e 11 (11p15.5), respectivamente. Mutações que ocorrem nos genes das cadeias globínicas do tipo alfa ou beta dão origem a uma patologia designada por hemoglobinopatia. Geralmente, as hemoglobinopatias podem ser divididas em talassémias, em que ocorre a redução/ausência da síntese de cadeias globínicas, e variantes de hemoglobina, caracterizadas por mutações na estrutura primária das cadeias globínicas. No entanto, estão ainda reportadas variantes com fenótipo talassémico e casos de conjugação de uma talassémia com uma variante estrutural. A chave para a identificação de mutações no gene globínico nos portadores ou indivíduos afectados é a compreensão da relação genótipo/fenótipo das várias mutações dos genes globínicos.

No presente estudo foram identificadas as alterações moleculares de 18 indivíduos afectados e/ou portadores de uma variante beta de hemoglobina já descrita ou não na literatura. As variantes já descritas estudadas foram: Hb Köln, Hb Leiden, Hb Saint Louis, Hb Shepherds Bush, Hb Malmö, Hb Vila Real, Hb San Diego, Hb S, Hb C, Hb D-Punjab, Hb E, Hb Lepore-Washington-Boston, Hb N-Baltimore, e Hb Aix-les-Bains. As variantes de hemoglobina não descritas na literatura foram: Hb Ponta Delgada e a variante que resulta de uma substituição de aminoácido na posição 142 da cadeia globínica beta. Funcionalmente foram estudadas a Hb Aix-les-Bains e a Hb Ponta Delgada.

## **ABSTRACT**

The hemoglobin is the protein of blood that transports oxygen from capillary tooth socket to tissues. This molecule consists of four globin chains, two alpha-like globin chains and two beta-like globin chains, which are linked to heme, an iron-porphyrin compound. The globin chains are codified in alpha and beta-globin gene cluster, localized in chromosome 16 (16p13.3) and 11(11p15.5), respectively. Mutations in alpha- or beta-like globin gene origin a pathology called hemoglobinopathy. Generally, hemoglobinopathies can be divided in thalassemias, in which occur reduced/absence synthesis of hemoglobin, and structural variant of hemoglobin, characterized by mutations in primary structure of globin chains. However, there are structural variant with thalassemic phenotype and cases of thalassemia and structural variant simultaneously. The key to identifying the globin gene mutations in carriers and affected patients is an understanding of the genotype/phenotype relationships of the various globin gene mutations.

In current study, identifying molecular alterations of 18 carriers and/or affected patients of  $\beta$  hemoglobin variant that are described or not in literature. Described variants were: Hb Köln, Hb Leiden, Hb Saint Louis, Hb Shepherds Bush, Hb Malmö, Hb Vila Real, Hb San Diego, Hb S, Hb C, Hb D-Punjab, Hb E, Hb Lepore-Washington-Boston, Hb N-Baltimore, and Hb Aix-les-Bains. No described variants were: Hb Ponta Delgada and variant which results of aminoacid substitution in position 142 of  $\beta$  globin chain. Hb Aix-les-Bains and Hb Ponta Delgada were studied functionally.

## **PALAVRAS-CHAVE**

Hemoglobina,

Hemoglobinopatias,

Variantes,

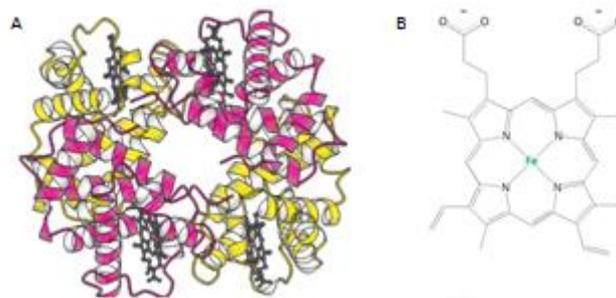
Mutação.



## **INTRODUÇÃO**

# 1. Hemoglobina

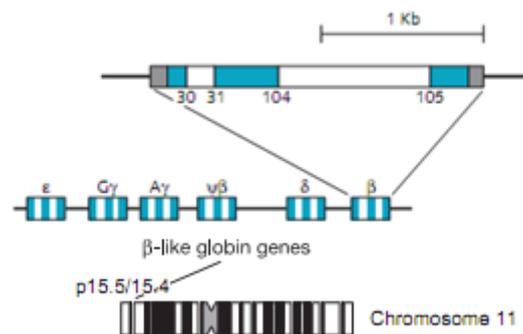
A hemoglobina (Hb), uma proteína que se encontra nos glóbulos vermelhos com um peso molecular de 64,458 KDa, (Wiwanitkit, 2008) (Clarke & Higgins, 2000) é composta por quatro cadeias globínicas, duas do tipo alfa ( $\alpha$ ) e duas do tipo beta ( $\beta$ ) (Schechter, 2008) (Marengo-Rowe, 2006) (Giambona, Passarello, Renda, & Maggio, 2009). A cada uma destas está ligado um grupo prostético (Figura 1A). Este grupo é uma ferro-protoporfirina IX e é denominada heme (Figura 1B) (Marengo-Rowe, 2006). Quando o ferro se encontra no estado divalente, ferroso, desempenha o papel de ligar ao oxigénio ( $O_2$ ) reversivelmente, levando deste modo à formação da oxi-Hb (Wiwanitkit, 2008).



**Figura 1 – Representação do heterotetrâmero da Hb humana e do grupo heme. A – A estrutura da hemoglobina é composta por duas subunidades  $\alpha$  (rosa) e duas  $\beta$  (amarelo). A molécula contém quatro grupos heme (a preto com o átomo de ferro a lilás). B – A ferro-protoporfirina com o ião ferro no estado ferroso que está ligado ao azoto (N) de cada uma das histidinas (Berg, Tymoczko, & Stryer, n.d.).**

O agrupamento génico humano  $\alpha$  globínico consiste em quatro genes funcionais: HBZ, HBA2, HBA1 e HBQ1, que codificam as cadeias globínicas zeta ( $\zeta$ ),  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$ , e teta ( $\theta$ ), respectivamente. Este agrupamento génico está localizado na região p13.3 do cromossoma 16, próximo do telómero e acima do controlo de regulação do potenciador HS-40 da cadeia globínica  $\alpha$ . O agrupamento génico humano globínico  $\beta$ , que reside na

região p15.5 do cromossoma 11, consiste em cinco genes funcionais: HBE1, HBG2, HBG1, HBD, e HBB] (Figura 2). Estes genes codificam as cadeias globínicas epsilon ( $\epsilon$ ), gama G ( $G\gamma$ ),  $A\gamma$ , delta ( $\delta$ ), e  $\beta$ , respectivamente (Patrinos, Kollia, & Papadakis, 2005) (Schechter, 2008) (Hartwell, Srisawang, Kongtawelert, Christian, & Grudpan, 2005)(Leach et al., 2001)(Clarke & Higgins, 2000). Depois da separação evolucionária dos dois *loci* globínicos mamíferos, cada *loci* sofreu mudanças complexas que resultaram na presença de múltiplos genes e pseudogenes não expressos no genoma humano. Durante os estados de desenvolvimento fetal, neonatal e adulto, o padrão de expressão destes genes desvia-se dos genes mais próximos do 5' no DNA para os mais próximos do 3' (Schechter, 2008) (Muncie & Campbell, 2009) (Hartwell et al., 2005) (Giambona et al., 2009).



**Figura 2 – Organização básica do gene globínico  $\beta$ .** A localização do agrupamento génico globínico  $\beta$  [5'- $\epsilon$ -(13.3 kb)- $G\gamma$ -(3.5 kb)- $A\gamma$ -(13.9kb)- $\delta$ -(5.4 kb)- $\beta$ -3'] é numa zona próxima do telómero do braço curto do cromossoma 11 como mostrado em baixo. Os genes estão representados como caixas no meio da segunda linha, nomeados de acordo com o polipeptídeo globínico que é codificado. A orientação da transcrição 5'-3' é da esquerda para a direita (Provan & Gribben, 2010). A ordem do gene reflete os tempos de expressão durante o desenvolvimento eritróide (Leach et al., 2001).

O gene globínico  $\beta$  é composto por 3 exões e 2 sequências de intervenção (intrões). Os intrões do gene  $\beta$  são constituídos, um por 122 – 130 pares de base (pb) entre os codões 30 e 31 e outro por 850 – 900 pb entre os codões 104 e 105 (Anexo 1).

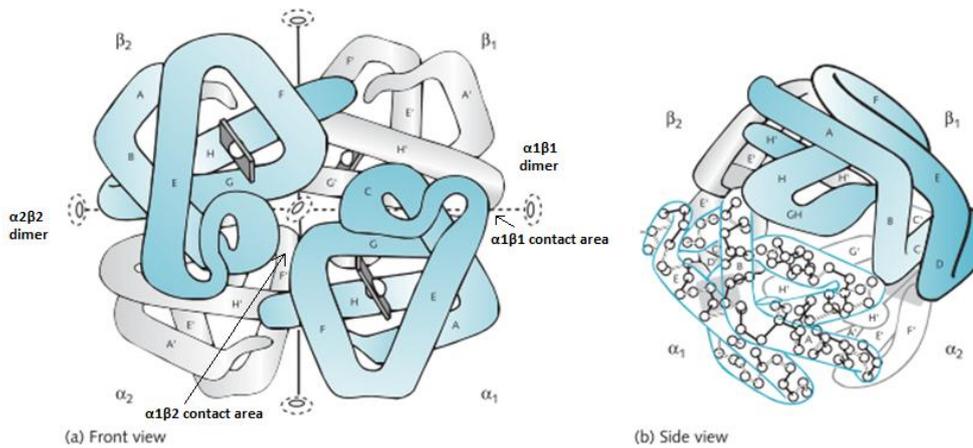
As sequências de DNA codificantes para o pré-mRNA de cada gene globínico incluem o local cap mRNA, codão de iniciação, locais de “splicing”, codões de terminação, e sinais de poliadenilação de mRNA (Schechter, 2008). O gene globínico  $\beta$  é regulado pela sua proximidade com um grupo de locais múltiplos super-hipersensíveis (HS) à DNase I na região 5', designado LCR, que é hipersensível à clivagem pela nuclease DNase I. O LCR está localizado de 8 a 22 kb antes do gene globínico  $\epsilon$ , e contribui significativamente para a activação do locus e regulação da expressão sequencial 5' a 3' dos genes globínicos durante o desenvolvimento (Anexo 2) (Schechter, 2008)(Leach et al., 2001)(Dean, 2006) (Li, Peterson, Fang, & Stamatoyannopoulos, 2002).

Durante a vida embrionária, fetal e adulta ocorrem mudanças na composição da Hb humana. O tipo de Hb é determinado pela sua composição em cadeias globínicas (Muncie & Campbell, 2009). A Hb A tem duas cadeias  $\alpha$  combinadas com duas  $\beta$  ( $\alpha_2\beta_2$ ), a HbA<sub>2</sub> tem duas cadeias  $\alpha$  e duas  $\delta$  ( $\alpha_2\delta_2$ ), e a Hb fetal (Hb F) tem duas cadeias  $\alpha$  combinadas com duas  $\gamma$  ( $\alpha_2\gamma_2$ ). No embrião, existem Hbs constituídas por duas cadeias  $\zeta$  combinadas com duas cadeias  $\gamma$  (Hb Portland,  $\zeta_2\gamma_2$ ) ou duas cadeias  $\epsilon$  (Hb Gower 1,  $\zeta_2\epsilon_2$ ), e duas  $\alpha$  e duas  $\epsilon$  formam a Hb Gower 2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) (Anexo 3) (Muncie & Campbell, 2009) (Hartwell et al., 2005)(Giambona et al., 2009). No adultos normais, Hb A, é o principal tipo de Hb e conta com aproximadamente com 96-98% do total de Hbs; Hb A<sub>2</sub> conta com aproximadamente 2-3,5%, e Hb F com menos de 1% (Little & Roberts, 2009) (Hartwell et al., 2005) (Swee Lay Thein, Menzel, Lathrop, & Garner, 2009) (Clarke & Higgins, 2000) (Giambona et al., 2009) (Schechter, 2008) (Sarnaik, 2005).

## 1.1.Hb A

As cadeias globínicas  $\alpha$  e  $\beta$  são compostas por cadeias polipeptídicas de 146 resíduos de aminoácidos (Anexo 4) (

Anexo 5), respectivamente, que por sua vez são constituídas por 8 porções helicoidais A-H. As porções interhelicoidais são denominadas pelas letras que precedem e sucedem as hélices (Figura 3) (Bird, 1972) (Marengo-Rowe, 2006) (Clarke & Higgins, 2000). A estrutura primária da Hb é composta por dois pares destas cadeias, e o seu enrolamento helicoidal regular compõe a estrutura secundária.



**Figura 3 – Molécula de Hb A.** A Hb A é composta por duas cadeias  $\alpha$  e duas  $\beta$ , que estão associadas em dois dímeros idênticos  $\alpha_1\beta_1$  ou  $\alpha_2\beta_2$ . Os contactos de empacotamento ( $\alpha_1\beta_1$  ou  $\alpha_2\beta_2$ ) envolvem as hélices B, G, e H, e o “corner” GH. Os contactos de deslizamento ( $\alpha_1\beta_2$  ou  $\alpha_2\beta_1$ ), que sofrem as mudanças principais quando o estado do heme é modificado, envolvem principalmente as hélices C e G e o “corner” FG. (a) Vista frontal mostra o tetrâmero da Hb A e os três eixos de simetria. A linha vertical (marcada por uma elipse sólida) marca o eixo de simetria duplo (a baixo deste eixo, é possível ver a primeira cavidade central constituída pelas cadeias  $\beta$ ). As elipses e as linhas a tracejado marcam os dois pseudoeixos de simetria, uma vez que a simetria é apenas aproximada. Os números a negrito representam os resíduos em contacto directo entre as cadeias  $\alpha_1$  e  $\beta_2$ . O dímero  $\alpha_1\beta_2$  (verde) nunca se dissocia e interage com o dímero  $\alpha_2\beta_1$  (tonalidade clara) para alterar a conformação de T para R. Alterações nesta área podem produzir Hbs com alta ou baixa afinidade. (b) A vista lateral do tetrâmero mostra o dímero estável, o qual se move ou dissocia (Provan & Gribben, 2010) (H Wajcman & Galactéros, 1996).

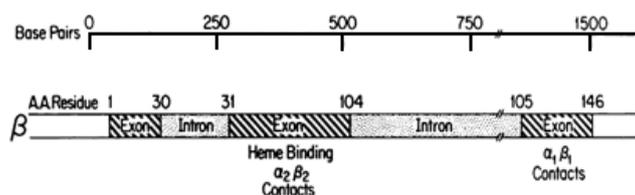
A estrutura terciária é composta por segmentos de hélice  $\alpha$  interceptados com regiões não helicoidais, que formam uma estrutura compacta de grande complexidade. Os resíduos de aminoácidos com características polares estão localizados à superfície da molécula em contacto com o ambiente aquoso. Por outro lado, no interior da molécula estão localizados os resíduos de aminoácidos não polares (Lorkin, 1973). A estrutura quaternária e, conseqüentemente as propriedades funcionais da Hb, são primariamente determinados pelas características de empacotamento das cadeias globínicas e pelos seus pontos de contacto (Figura 3) (Bird, 1972). As características de empacotamento incluem 7 secções de hélices  $\alpha$  peptídicas das cadeias  $\alpha$  e 8 das  $\beta$  (Figura 3). Estas hélices por sua vez são empacotadas formando um glóbulo compacto que heterodimeriza e depois forma a estrutura tetramérica (Schechter, 2008). As porções não helicoidais encontram-se nas partes lineares das cadeias. Seis aminoácidos do terminal

N são não-helicoidais e incluem os resíduos assimétricos de prolina que contribuem para o empacotamento da cadeia (Heller, 1965).

Cada polipeptídeo do tetrâmero da Hb tem um espaço central largo, uma cavidade, entre as hélices E e F, onde o grupo prostético está localizado, e este por sua vez interage com a molécula globínica estabilizando a sua estrutura (Bird, 1972) (Heller, 1965). Na cadeia globínica  $\beta$ , as posições dos resíduos de aminoácidos, que estão em contacto com o grupo heme, são 31 (Leu), 38 (Thr), 41 (Phe), 42 (Phe), 44 (Ser), 45 (Phe), 63 (His), 66 (Lys), 67 (Val), 70 (Ala), 71 (Phe), 88 (Leu), 91 (Leu), 92 (His), 96 (Leu), 98 (Val), 102 (Asn), 103 (Phe), 106 (Leu), 137 (Val), 141 (Leu). Estes resíduos de aminoácidos estão localizados principalmente no exão 2 do gene globínico  $\beta$  (Figura 4). O grupo heme está próximo da superfície da molécula, com o ião ferro do heme a formar uma ligação com a histidina na posição 87 na cadeia  $\alpha$  ou na posição 92 na cadeia  $\beta$  (histidinas proximais). O local de oxigenação reversível é a sexta posição de coordenação do ião ferro que aponta para outro resíduo de histidina na posição 63 na cadeia  $\beta$  ou na posição 58 na cadeia  $\alpha$  (histidinas distais). O arranjo arquitectónico dos dois pares de cadeias polipeptídicas, com um grupo heme introduzido entre duas porções helicoidais de cada cadeia aparentemente realiza uma possível interacção heme-heme (Schechter, 2008).

O tetrâmero Hb possui dois tipos de subunidades interfaces, o dímero interface  $\alpha 1\beta 1$  e o dímero interface  $\alpha 1\beta 2$ . As hélices B, G e H e o “corner” GH estão envolvidas em contactos nas interfaces  $\alpha 1\beta 1$  ou  $\alpha 2\beta 2$ , enquanto os contactos na interface  $\alpha 1\beta 2$  (ou  $\alpha 2\beta 1$ ) envolvem principalmente as hélices C e G e o “corner” FG. A Figura 4 mostra os exões do gene  $\beta$  onde estão localizados os nucleótidos que estão na origem dos aminoácidos incluídos nos contactos  $\alpha 1\beta 1$  e  $\alpha 2\beta 2$ . Quando a Hb A varia entre a forma

desoxi (estado tenso – T) e a oxi (estado relaxado – R), os contactos  $\alpha 1\beta 2$  e  $\alpha 2\beta 1$  (contactos de deslizamento) sofrem as mudanças principais associadas à ligação cooperativa do oxigénio (Manconi et al., 2010) (H Wajcman & Galactéros, 1996). Na estrutura T, 126 átomos de 32 resíduos estão envolvidos nos contactos de empacotamento, e 107 átomos de 27 resíduos nos contactos de deslizamento. Na estrutura R, 35 cadeias laterais participam nos contactos de empacotamento, e 18 participam em contactos de deslizamento (H Wajcman & Galactéros, 1996). No estado desoxi da Hb, as posições dos resíduos de aminoácidos das cadeias  $\beta$  envolvidos no contacto  $\alpha 1\beta 1$  são 30 (Arg), 33 (Val), 34 (Val), 35 (Tyr), 55 (Met), 108 (Asn), 112 (Lys), 115 (Ala), 116 (His), 119 (Gly), 122 (Phe), 123 (Thr), 124 (Pro), 125 (Pro), 127 (Gln), 128 (Ala), 131 (Gln). Pelo contrário, no contacto  $\alpha 1\beta 2$ , as posições são 34 (Val), 25 (Tyr), 36 (Pro), 37 (Trp), 40 (Arg), 41 (Phe), 43 (Glu), 97 (His), 98 (Val), 99 (Asp), 100 (Pro), 101 (Glu), 102 (Asn), 105 (Leu), 145 (Tyr), 146 (His) (Masala & Manca, 1992).

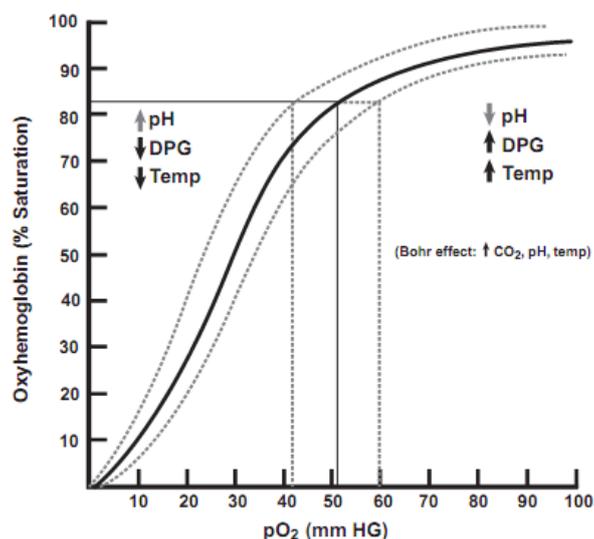


**Figura 4 – Representação do gene globínico  $\beta$  humano. O exões estão representados por retângulos riscados e constituem a porção codificante do gene. Os segmentos de intervenção (intrões) estão representados pelas áreas a cinzentos (Bunn, 1981).**

## 1.2. Função da Hemoglobina

A função principal da hemoglobina é o transporte respiratório de duas vias, transportando o  $O_2$  dos pulmões para os tecidos e facilitando o transporte inverso de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) (Hartwell et al., 2005) (Patrinos et al., 2005). Durante as

mudanças de oxigenação e desoxigenação, a estrutura quaternária muda de forma. Este movimento é a rotação dos resíduos das cadeias  $\beta$  na proximidade do heme, reflecte na oxigenação a proximidade de  $7\text{\AA}$  do átomo de ferro em relação aos resíduos (Bird, 1972). As “desoxi” e “oxi” Hb e exibem baixa e alta afinidade para o  $O_2$ , respectivamente (Anexo 6). (Yonetani, Park, Tsuneshige, Imai, & Kanaori, 2002) (Provan & Gribben, 2010) A transição entre estas duas conformações envolve a mudança de energia livre, refletindo-se como cooperatividade entre as subunidades. A cooperatividade é o fenómeno no qual a molécula de Hb modula a sua afinidade para o  $O_2$  quando está parcialmente saturada (H Wajcman & Galactéros, 1996) (Provan & Gribben, 2010). A interacção cooperativa entre os locais de ligação do oxigénio é revelada por uma curva de equilíbrio de  $O_2$  com forma sigmóide (Figura 5) (Marengo-Rowe, 2006). Esta curva também reflete a transição do estado desoxi para o oxi (Provan & Gribben, 2010).



**Figura 5 – Curva de dissociação hemoglobina-oxigénio. Quando o  $P_{50}$  está abaixo do normal (a curva é desviada para a esquerda), a afinidade da Hb para o  $O_2$  aumenta. Um aumento do  $P_{50}$  (deslocamento da curva para a direita) diminui a afinidade da Hb para o  $O_2$  e melhora a libertação eficaz de oxigénio (Martin H. Steinberg, Forget, Higgs, & Weatherall, 2009).**

Na primeira parte da curva, a afinidade para o  $O_2$  é baixa, e neste caso a Hb está totalmente desoxigenada. Quando a inclinação da curva é acentuada, as moléculas  $O_2$  ligam-se à Hb, e a afinidade para o  $O_2$  aumenta. A forma sigmóide da curva de dissociação de  $O_2$  reflecte ainda a capacidade da Hb de libertar  $O_2$  (Figura 5) (Provan & Gribben, 2010). A ligação reversível de gases nas cadeias globínicas permitem à Hb o transporte de  $O_2$ , monóxido de carbono (CO) e monóxido de azoto (NO) (Schechter, 2008). A afinidade da Hb para o  $O_2$  é medida pelo ponto de saturação de 50% ( $p_{50}$ ), tensão do  $O_2$  para a qual a Hb está metade saturada. Quanto maior é a afinidade para o  $O_2$ , mais baixo é o valor de  $p_{50}$ . A afinidade ao  $O_2$  por ser modificada de várias maneiras (Figura 5): diminui com o aumento de  $CO_2$  (Efeito de Bohr, pH), diminui com o aumento dos níveis de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), aumenta com o decréscimo da temperatura (Provan & Gribben, 2010) (Marengo-Rowe, 2006).

O efeito de Bohr resulta da ligação dos protões a vários resíduos na desoxi e oxi Hb, e é teoricamente medido pelo número de protões libertados na transição do estado desoxi-oxi, e na prática pelo declive da curva representativa do  $\log p_{50}$  em função de pH. A ligação dos protões desviam-se do equilíbrio R-T para o estado T. A desoxi Hb é estabilizada, levando a uma grande tendência para o  $O_2$  ser libertado nos tecidos. Por outro lado, o 2,3-DPG está presente nos glóbulos vermelhos numa concentração aproximada de 2 mM. A estrutura Hb desoxi na presença de 2,3-DPG revela que uma molécula de 2,3-DPG liga na cavidade da Hb. Assim o 2,3-DPG liga preferencialmente à Hb desoxi estabilizando-a, reduzindo efectivamente a sua afinidade para o  $O_2$ .

Concluindo, a Hb tem uma elevada afinidade para o  $O_2$  e uma baixa afinidade para o  $CO_2$ , fosfatos orgânicos, e iões de hidrogénio e cloreto, na circulação arterial, e afinidades relativas invertidas na circulação venosa. Este fenómeno acontece devido ao

facto do O<sub>2</sub> se ligar reversivelmente ao ião ferro no estado ferroso em cada grupo heme.

(Marengo-Rowe, 2006)

## 2. Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias são desordens na Hb e são as doenças hereditárias autossômicas recessivas mais comuns, com uma alta frequência de portadores (7% da população mundial) (Anexo 7) (Patrinos et al., 2005) (Aguilar-martinez et al., 2010) (Kohne & Kleihauer, 2010) (Old, 2003) (Gihan Adly, 2008) (Saechan, Nopparatana, Nopparatana, & Fucharoen, 2010) (Jeremiah, 2006) (George Priya Doss & Rao, 2009) (B Modell et al., 2007) (Henri Wajcman & Francina, 2009) (George Priya Doss & Rao, 2009). As desordens da Hb incluem as talassémias (desequilíbrio da síntese de cadeias globínicas normais), variantes de Hb (alterações na estrutura da Hb) e em alguns casos, ambos os fenótipos (Hartwell et al., 2005) (D J Weatherall & Clegg, 2001) (Old, 2003) (Wiwanitkit, 2008) (Patrinos et al., 2005) (Saechan et al., 2010) (Sarnaik, 2005) (Bernadette Modell & Darlison, 2008) (Boncimino, Bertaina, & Locatelli, 2010) (Calvo-Villas et al., 2006) (Clarke & Higgins, 2000) (Colah et al., 2007) (George Priya Doss & Rao, 2009). Uma vasta heterogeneidade de fenótipos clínicos e hematológicos caracterizam estas desordens, e o seu rastreio também é diferente (Anexo 8). As cadeias globínicas mais afectadas são as  $\alpha$  e as  $\beta$  (Patrinos et al., 2005) (Aguilar-martinez et al., 2010) (Kohne & Kleihauer, 2010) (Old, 2003) (Gihan Adly, 2008) (Saechan et al., 2010) (Jeremiah, 2006) (George Priya Doss & Rao, 2009) (B Modell et al., 2007).

Cada país tem o seu próprio espectro mutacional de variantes de Hb e talassémias. As desordens hereditárias da Hb (desordens de células falciformes e talassémias) foram originalmente características e frequentes nos trópicos e subtropicais, tal como a bacia do Mediterrâneo, África, e Médio Oriente, devido à malária endémica (Patrinos et al., 2005) (Old, 2003) (Gihan Adly, 2008) (Saechan et al., 2010) (Jeremiah, 2006) (Aguilar-martinez et al., 2010) (George Priya Doss & Rao, 2009) (Kohne &

Kleihauer, 2010) (B Modell et al., 2007) (Hartwell et al., 2005). No início do século passado, as anomalias da Hb eram limitadas às regiões onde a malária era endémica ou às populações, que tinham origem nesses países. Hoje em dia, a incidência das hemoglobinopatias nos países industrializados mudou devido aos fluxos migratórios (Henri Wajcman & Francina, 2009) (Sarnaik, 2005) (Aguilar-martinez et al., 2010) (George Priya Doss & Rao, 2009) (Kohne & Kleihauer, 2010). Algumas desordens de Hb (Hb S, C, E, D Punjab,  $\beta$  talassémia) aparecem com altas frequências génicas nas regiões endémicas da malária. Esta situação ocorre porque as hemoglobinopatias referidas conferem uma certa protecção contra a malária (Bernadette Modell & Darlison, 2008).

Um indivíduo com uma desordem de Hb no estado homocigótico apresenta alelos idênticos de um gene em ambos os cromossomas homólogos. Em contraste, dois alelos diferentes de um gene estão em ambos os cromossomas homólogos, no estado heterocigótico (Henri Wajcman & Francina, 2009) (Sarnaik, 2005) (Aguilar-martinez et al., 2010) (George Priya Doss & Rao, 2009) (Kohne & Kleihauer, 2010). Os portadores de variantes estruturais têm 30-50% de variante Hb nos seus glóbulos vermelhos. Os portadores de talassémia têm os glóbulos vermelhos mais pequenos e às vezes anemia de severidade média, e os portadores de  $\beta$ -talassémia têm também mais de 3.5% de Hb A<sub>2</sub> (Bernadette Modell & Darlison, 2008) (Jeremiah, 2006).

## **2.1. Variantes de Hemoglobina**

Pelo menos 5.2% da população mundial é portadora de uma variante significativa (Bernadette Modell & Darlison, 2008) (Jeremiah, 2006) (D J Weatherall & Clegg, 2001) (Sarnaik, 2005). As variantes de Hb estruturais são caracterizadas por uma

mutação no gene de uma cadeia globínica, i.e., a troca de diferentes aminoácidos numa determinada posição de uma cadeia. As variantes de Hb podem resultar de vários mecanismos: substituição de uma base nucleotídica levando à troca de um aminoácido ou a cadeias de terminação; deleções ou adições de nucleótidos levando variantes “frameshift”; e a cruzamento não homólogo, levando à produção de cadeias globínicas de fusão (Forget et al 1979). Estas mutações podem ser inócuas, em muitos casos, mas podem alterar a estabilidade ou propriedades funcionais da Hb levando a uma desordem clínica. Aproximadamente 1000 diferentes alelos mutantes têm sido caracterizados ao nível molecular, como documentado na base de dados de variantes de Hb, HbVar (Old, 2003)(Hartwell et al., 2005)(D J Weatherall & Clegg, 2001)(C. Bento et al., 2006)(Patrinos et al., 2005) (Christopoulou, Tserga, Patrinos, & Papadakis, 2004)(Hardison et al., 2002). No entanto, apenas 3 variantes têm altas frequências, Hb S, Hb C, e Hb E. (Moradkhani et al., 2009) (Hartwell et al., 2005) (D J Weatherall & Clegg, 2001)(Clarke & Higgins, 2000) (D J Weatherall & Clegg, 2001)

A maioria das variantes de Hb resultam de mutações pontuais nas cadeias globínicas  $\alpha$  e  $\beta$ , alterando as suas estruturas primárias, e levando à substituição de um aminoácido por outro (Bry, Chen, & Sacks, 2001) (Clarke & Higgins, 2000)(Old, 2003)(Hartwell et al., 2005) (D J Weatherall & Clegg, 2001) (Patrinos et al., 2005) (Christopoulou et al., 2004)(Hardison et al., 2002). Os efeitos funcionais destas mutações pontuais dependem do local onde a mutação “missense” ocorre. Estas anomalias variam de uma simples mudança de carga eléctrica da molécula a severas distorções moleculares. A mudança pode ser benigna (padrões hematológico e clínico normais) ou pode levar a severos efeitos patológicos (e.g. anemia severa) (Moradkhani et al., 2009)(Deutsch et al., 1999).

As variantes de Hb podem ser de vários tipos, podem causar anemia hemolítica (e.g. Hb S), instabilidade (e.g., Hb Köln), metamoglobinemia (e.g., Hbs M), cianose (e.g., Hb Kansas) ou policitemia devido ao aumento da afinidade ao oxigénio (e.g., Hb Malmö), tendência para agregar (e.g., Hb S, Hb C), baixa afinidade ao oxigénio, baixa capacidade de transportar oxigénio (Hb M), ou serem silenciosas (Hb Iraq-Halabja). Existem ainda algumas variantes que também levam a fenótipos talassémicos (e.g. Hb E), e ainda associadas a talassémias (combinação da Hb E com talassémia  $\beta$ ) (Moradkhani et al., 2009)(Deutsch et al., 1999).

A nomenclatura de hemoglobinopatia consiste numa variedade de letras, consoante o tipo de variante (e.g., Hb S, Hb C, a Hb D), nomes do local onde foram descobertas primeiro ou residência do propósito (e.g., Hb Edmonton), e nomes de família de casos índice (e.g., Hb Lepore). A nomenclatura sistemática lógica e informativa identifica a cadeia, a localização, e a substituição de aminoácido na cadeia globínica envolvida (Clarke & Higgins, 2000) (R. G. H. Cotton, 1996).

### **2.1.1. Hemoglobina instável**

A estabilidade do tetrâmero está dependente das posições moleculares internas dos aminoácidos não-polares e da estabilidade dos contactos  $\alpha 1\beta 1$ , que em condições normais mantêm as quatro cadeias juntas. Quando uma ou mais propriedades destas estão disruptas, formam-se Hbs instáveis (Marengo-Rowe, 2006) (Sarnaik, 2005) (Provan & Gribben, 2010) (Martin H. Steinberg et al., 2009). Algumas Hbs instáveis podem ser o resultado da disrupção da estrutura secundária da molécula pelo lado da cadeia que não é hélice  $\alpha$  (comummente como um resultado da substituição de prolina), e destabilização do heme da cadeia globínica. Outro grupo de Hbs instáveis envolve

substituições internas que interferem com a estabilização de interações hidrofóbicas. Ainda existem outros dois grupos que resultam de anomalias estruturais de grande dimensão nas subunidades globínicas, tais como deleções nas regiões nos ou próximas dos “corners” interhelicoidais, ou a cadeias globínicas alongadas, ou de fusão, interferência com a estrutura terciária da subunidade e alteração de interações que interferem com a estrutura quaternária. O mecanismo de destruição dos glóbulos vermelhos envolve o deslocamento do heme, que destabiliza o tetrâmero de Hb, a sua composição em subunidades globínicas e leva à formação de hemicromo. As subunidades globínicas agregam e precipitam, provocando a deformabilidade reduzida e remoção ou aprisionamento dos glóbulos vermelhos que contêm corpos Heinz (Provan & Gribben, 2010) (Martin H. Steinberg et al., 2009).

Alguns exemplos de Hbs instáveis são Hb Köln [ $\beta 98$  (Val $\rightarrow$ Met)], Hammersmith [ $\beta 42$  (Phe $\rightarrow$ Ser)], Bristol [ $\beta 67$  (Val $\rightarrow$ Asp)], Gun Hill [ $\beta 91\rightarrow 95$  del] e Montreal [ $\beta 73\rightarrow 75$  del, ins], Hb Leiden, Hb Saint Louis (Marengo-Rowe, 2006) (Sarnaik, 2005).

### **2.1.2. Hemoglobinas com afinidade para o oxigénio alterada**

Uma Hb anormal pode ter uma curva de dissociação de oxigénio anormal por causa de uma anomalia intrínseca de dissociação Hb-O<sub>2</sub>, uma interação alterada da Hb com 2,3-DPG, um efeito de Bohr alterado, ou a combinação de qualquer uma das causas mencionadas. A curva de dissociação do O<sub>2</sub> desloca-se para a direita, com a diminuição da afinidade da Hb para o O<sub>2</sub>, ou para a esquerda com o aumento da afinidade da Hb para o O<sub>2</sub> (Marengo-Rowe, 2006). Muitas destas Hbs resultam de substituições de aminoácidos que afectam o equilíbrio entre os estados R e T, de substituições na

interface  $\alpha 1\beta 2$ , no terminal C da cadeia  $\beta$  e nos locais de ligação do 2,3-DPG (Provan & Gribben, 2010).

#### **2.1.2.1. Hemoglobinas com alta afinidade para o oxigénio**

As Hbs com alta afinidade para o  $O_2$  ligam o  $O_2$  mais avidamente que o normal e entregam-no nos tecidos de forma ineficaz, resultando numa oxigenação ineficiente dos tecidos. A baixa concentração de  $O_2$  nos tecidos leva a uma anoxia relativa e aumento da produção de eritropoietina, que por sua vez estimula a produção de glóbulos vermelhos causando policitemia. Tais Hbs têm substituições de aminoácidos envolvendo a interface dos contactos  $\alpha 1\beta 2$  (contacto de deslizamento) do tetrâmero que conectam os dímeros  $\alpha 1\beta 1$  e  $\alpha 2\beta 2$ , resultando num aperto do  $O_2$ ; ou têm substituições envolvendo resíduos do terminal C da cadeia  $\beta$ , locais de ligação do 2,3-DPG na cavidade central (Hb Dominion -  $\beta 143 \text{ Val} \rightarrow \text{Met}$ ), interface  $\alpha 1\beta 1$  [favorece a mudança estrutural para o estado R, Hb San Diego ( $\beta 109 \text{ His} \rightarrow \text{Tyr}$ )],  $\alpha 2\beta 2$ , mutações na cavidade do heme, constrangimento na mudança da conformação quaternária através da polimerização (Hb Porto Alegre ( $\beta 9 \text{ Ser} \rightarrow \text{Cys}$ ) ou heterogeneidade de mutações. Todas estas substituições favorecem a conformação oxigenada e por isso causam um desvio na curva de dissociação para a esquerda (Provan & Gribben, 2010)(Martin H. Steinberg et al., 2009).

#### **2.1.2.2. Hemoglobinas com baixa afinidade para o oxigénio**

As Hbs com baixa afinidade para o  $O_2$  resultam da substituição de aminoácidos próximos da interface  $\alpha 1\beta 1$  ou entre a cadeia globínica e o heme (Marengo-Rowe, 2006) (Sarnaik, 2005) (Abdulmalik et al., 2004). Alterações nas regiões moleculares directamente envolvidas na transição R-T resultam numa estabilização do estado T ou

destabilização do estado R. As Hbs com baixa afinidade par o O<sub>2</sub> entregam mais eficientemente O<sub>2</sub> nos tecidos por grama de Hb, e isto reflete-se no desvio da curva de dissociação do Hb-O<sub>2</sub> para a direita relativamente ao normal, e no aumento no p50 (Martin H. Steinberg et al., 2009).

### **2.1.3. Hemoglobina S**

A Hb S [ $\beta$ 6 (A3) GAG>GTG c.20A>T p.Glu7Val] resulta da substituição de um resíduo de ácido glutâmico por um de valina na posição 6 da cadeia globínica  $\beta$  (Marengo-Rowe, 2006) (Breda, Gambari, & Rivella, 2009) (Giménez et al., 2009). Esta substituição leva à produção de uma Hb electroforeticamente distinta, como descrito por Linus Pauling em 1949. O resíduo de valina tem uma carga negativa menor do que o ácido glutâmico, e desta forma a Hb S move-se mais lentamente do que a Hb A numa electroforese.

A Hb S polimeriza na conformação desoxigenada em fibras longas compostas por filamentos de tetrâmeros Hb S. A Hb S na forma desoxi Hb S favorece as interacções hidrofóbicas entre cada cadeia e as suas adjacentes, ocorrendo desta forma polímeros insolúveis. Existem ainda outros resíduos na cadeia  $\beta$  que participam neste processo. A interacção da valina na posição 6 com a fenilalanina na posição 85, e a leucina na posição 88 na sua cadeia par é estereoquimicamente indisponível na oxi Hb. As fibras das Hb S desoxi polimerizadas são responsáveis pela desidratação, rigidez, e lise dos glóbulos vermelhos (Anexo 9) (Marengo-Rowe, 2006) (Jorge et al., 2012) (Geva et al., 2004).

As doenças falciformes são encontradas com elevada frequência nas populações afro-caribeniana e esporadicamente em toda a região do Mediterrâneo, da Índia e do Médio Oriente (Jeremiah, 2006).

Existem várias formas de desordens de falcização: SS - homozigóticos para a Hb S (Sem alelos  $\beta$  normais, sem Hb A), também designada anemia de células falciformes ou doença falciforme; SC – dupla heterozigotia para duas cadeias  $\beta$  mutantes, Hb S e Hb C (Sem alelos  $\beta$  normais, sem Hb A); S-talassémia  $\beta$  - dupla heterozigotia para Hb S e talassémia  $\beta$ ; SO Arab e SD – Dupla heterozigotia para Hb S e Hb O ou D, respectivamente; Persistência hereditária de Hb F com Hb S, em que existe uma falha na mudança da síntese de cadeias  $\gamma$  para  $\beta$  correlacionada com Hb S (Sarnaik, 2005) (Marengo-Rowe, 2006) (Jeremiah, 2006) (Giménez et al., 2009) (Lionnet et al., 2011).

A doença das células falciformes é extramente variável na sua severidade, que por sua vez pode ser afectada por vários factores, incluindo a presença de marcadores genéticos tais como os haplótipos do gene  $\beta$ , a co-inerência com a talassémia  $\alpha$  (benéfica) e a quantidade e distribuição da Hb F (níveis elevados são benéficos) (Sarnaik, 2005) (Akinsheye et al., 2011). A Hb S tem mostrado ser relativamente inadequada no desenvolvimento do *Plasmodium falciparum*. Deste modo, na área geográfica onde a malária é endémica, o gene falciforme tem uma vantagem selectiva. Estudos revelaram que em heterozigóticos AS com *P. falciparum* malária, as células parasitadas eram mais propensas a falcização que as não parasitadas. Isto sugeriu que as células parasitadas, apenas falciformes, são mais facilmente removidas da circulação e que este é o mecanismo principal que confere a vantagem selectiva nos heterozigóticos AS (Bird, 1972).

Existem ainda outras Hbs que induzem falcização. Hb C-Harlem e a Hb Memphis produzem células falciformes pelo mesmo mecanismo da Hb S. A Hb C-Georgetown, I, e Porto Alegre são outros exemplos de Hbs que induzem falcização (Bird, 1972).

#### **2.1.4. Variantes talassémicas**

As hemoglobinopatias talassémicas são um grupo de desordens genéticas caracterizadas pelas alterações da estrutura e da produção das cadeias globínicas da molécula de Hb, e ocorrem com raramente (Muncie & Campbell, 2009) (Podda et al., 1991). Estas Hbs mutantes podem resultar de um cruzamento desigual de genes (e.g. Hb Lepore), cadeias globínicas hiperinstáveis, defeitos na região codificante que criam locais “splice” alternativos para o “splicing” do mRNA com substituições de aminoácidos associadas (e.g., Hb E), mutações na região codificante silenciosa que criam locais “splice” alternativos, e substituições de aminoácidos associadas com uma mutação talassémica adicional no mesmo cromossoma (M H Steinberg & Adams, 1983).

Algumas variantes de Hb hiperinstáveis manifestam-se com um quadro clínico semelhante a talassémia no estado heterozigótico. Em alguns casos, a variante de Hb precipita e sofre esgotamento rápido mesmo antes da cadeia anormal ser montada e estar associada com as outras cadeias para formar a molécula de Hb (Podda et al., 1991). As substituições nucleotídicas silenciosas podem produzir talassémia ou ser totalmente inócuas, dependendo do local e tipo de mutação. As substituições de aminoácidos na região codificante pode causar talassémia, uma qualquer variante de Hb patológica, ou variantes de Hb inteiramente inofensivas. Tudo depende do local no gene

onde ocorre a mudança nucleotídica e da nova sequência produzida (M H Steinberg & Adams, 1983).

### **2.1.5. Hemoglobina M**

As Hbs M resultam de mutações que estabilizam o íon ferro do heme no estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Provan & Gribben, 2010). Nas Hbs M ocorrem substituições de aminoácidos localizadas estrategicamente, com características moleculares particulares, responsáveis por distúrbios na função normal do heme (Heller, 1965). Nestas hemoglobinas, todas as substituições de aminoácidos envolvem ou as próprias histidinas ou os aminoácidos que formam a cavidade do heme (Marengo-Rowe, 2006) (Sarnaik, 2005) (Beauvais, 2000). Para a Hb se combinar com o  $\text{O}_2$ , os seus átomos de ferro devem estar no estado ferroso. Se ocorrer oxidação da molécula de Hb, o ferro ferroso é convertido a ferro férrico, a metemoglobina é formada, e ocorre a perda de capacidade de transportar  $\text{O}_2$ . O sistema enzimático que reduz a metemoglobina normal funciona normalmente em eritrócitos de indivíduos com Hb M, mas é incapaz de reduzir a metemoglobina M, que por isso é mantida no estado oxidado. O resultado é um estado cianótico crônico. O ferro é auto-atacado num dos lados da cavidade (hélices E ou F) pelo resíduo de histidina – proximal (F8) ou distal (E7). Todos os dias, cerca de 1% do total da concentração de Hb circulante é convertida em metemoglobina (Marengo-Rowe, 2006)(Kutlar et al., 2009) (Sarnaik, 2005) (Beauvais, 2000).

A presença de metemoglobinas anormais é confirmada por espectrofotometria. A metemoglobina normal revela um pico de absorção máximo aos 630 nm. Pelo contrário, a metemoglobina anormal revela um movimento característico de picos de absorção entre os 600 e os 635 nm. A Hb normal revela um pico de absorvância

máximo aos 542 nm, no qual é possível verificar a quantidade de Hb (Sarnaik, 2005) (Beauvais, 2000).

A Hb M<sub>Boston</sub> ( $\alpha_2^{58\text{Tyr}}\beta_2^A$ ), Hb M<sub>Saskatoon</sub> ( $\alpha_2^A\beta_2^{63\text{Tyr}}$ ), Hb M<sub>Milwaukee 1</sub> ( $\alpha_2^A\beta_2^{67\text{Glu}}$ ) e Hb M<sub>Iwate</sub> ( $\alpha_2^{87\text{Tyr}}\beta_2^A$ ) são exemplos de Hb M (Heller, 1965).

## 2.2. Talassémias

As talassémias são um grupo de desordens hematológicas autossômicas recessivas hereditárias e são considerados doenças quantitativas da Hb (Sarnaik, 2005) (Fang & Xu, 2010) (Clarke & Higgins, 2000). Estas envolvem mutações no agrupamento gênico globínico que causam o desequilíbrio das cadeias globínicas devido à síntese reduzida ou ausência de cadeias normais, e são classificadas de acordo com a cadeia globínica afectada. Podem ser encontradas talassémias  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta\beta$ , e  $\epsilon\delta\beta$ , mas as mais comuns e relevantes clinicamente são as  $\alpha$  e  $\beta$  (D J Weatherall & Clegg, 2001) (Hartwell et al., 2005) (Patrinos et al., 2005) (Schechter, 2008) (Galanello & Origa, 2010) (Sarnaik, 2005) (Gihan Adly, 2008) (Breda et al., 2009). O desequilíbrio das cadeias globínicas causa hemólise e eritropoiese anormal, e leva à formação de um quadro clínico de anemia hemolítica (Sarnaik, 2005)(Fang & Xu, 2010) (Clarke & Higgins, 2000) (D J Weatherall & Clegg, 2001) (Hartwell et al., 2005) (Patrinos et al., 2005) (Galanello & Origa, 2010) (Gihan Adly, 2008) (Breda et al., 2009). Mais de 100 mutações diferentes têm sido descritas, e incluem mutações deleccionais ou não-deleccionais. As talassémias  $\alpha$  geralmente resultam de deleccões e as  $\beta$  de mutações pontuais (Sarnaik, 2005). Apenas cerca de 1.7% da população mundial têm o traço de talassémia  $\alpha$  ou  $\beta$ .

A produção reduzida ou ausência de cadeias globínicas pode ser causada por mutações nos elementos de DNA reguladores, que afectam a eficiência da transcrição, assim como, mutações na sequência codificante que afectam as modificações pós-transcripcionais ou eficiência da tradução. Estas últimas são manifestadas clinicamente como síndromes talassémicas, que surgem da combinação de produção inadequada de Hbs e de acumulação desequilibrada de um tipo de cadeias (D J Weatherall & Clegg, 2001) (Hartwell et al., 2005) (Patrinos et al., 2005) (Schechter, 2008) (Galanello & Origa, 2010) (Sarnaik, 2005) (Gihan Adly, 2008) (Breda et al., 2009).

A talassémia  $\alpha$  ocorre mais com mais frequência em indivíduos descendentes de África ou Sudeste da Ásia, e a talassémia  $\beta$  é mais comum em indivíduos do Mediterrâneo, África e Sudeste Asiático (Anexo 10) (Sarnaik, 2005) (Cohen, Galanello, Pennell, Cunningham, & Vichinsky, 2004). O fenótipo, para pacientes com mutações similares, podem variar de assintomáticos a dependentes de transfusão (Cohen et al., 2004) (Hartwell et al., 2005) (Giambona et al., 2009).

### **2.2.1. Talassémia beta**

As talassémias  $\beta$  caracterizam-se pela síntese reduzida ou ausência de cadeias globínicas  $\beta$ , resultando em Hb reduzida nos glóbulos vermelhos, diminuição da produção de glóbulos vermelhos e anemia (Galanello & Origa, 2010) (Muncie & Campbell, 2009) (Cao, Moi, & Galanello, 2011)(D. J. Weatherall, 1998). Estão reportadas cerca de 200 talassémias  $\beta$  na HbVar database (<http://globin.cse.psu.edu>) (Muncie & Campbell, 2009)(Khelil et al., 2010) (D J Weatherall & Clegg, 2001). A frequência elevada de talassémia  $\beta$  em determinadas regiões está relacionada com a malária (*P. falciparum*). Na população portuguesa as mutações mais comuns são: codão

39 (C→T), IVS-I-1 (G→A), IVS-I-6 (T→C) e IVS-I-110 (G→A) (Anexo 10)(Faustino, Pacheco, Loureiro, Nogueira, & Lavinha, 1999)(Faustino et al., 1992)(Cabeda et al., 1999).

Existem três formas principais de talassémia  $\beta$ : talassémia major, talassémia intermédia e talassémia minor. Indivíduos com talassémia major são homozigóticos ou compostos heterozigóticos para genes  $\beta^0$  ou  $\beta^+$ , indivíduos com talassémia intermédia são principalmente homozigóticos ou compostos heterozigóticos, e indivíduos com talassémia minor são heterozigóticos, e geralmente resultam em estados clínicos silenciosos. A talassémia  $\beta$  pode estar associada com variantes de Hb (e.g. Hb C, Hb E, Hb S), e persistência hereditária da Hb F. Pode-se também encontrar talassémias  $\beta$  na forma dominante autossomal, associada com mutações que resultam em variantes  $\beta$  altamente instáveis, ou pode ainda estar associada a outro tipo de síndromes (Galanello & Origa, 2010) (Muncie & Campbell, 2009) (Sarnaik, 2005) (Clarke & Higgins, 2000) (Patrinos et al., 2005).

A maioria das talassémias  $\beta$  são causadas por mutações pontuais, substituição de uma única base ou deleção de codões intactos (destabilização), no gene ou nas suas sequências de *flanking* imediatas, e são classificadas de acordo com o mecanismo pelo qual afectam a regulação do gene: transcrição, processamento de RNA e tradução de RNA (Das & Talukder, 2002). São classificadas também como  $\beta^0$  e  $\beta^+$  de acordo com a quantidade de cadeias globínicas sintetizadas (Breda et al., 2009) (Clarke & Higgins, 2000) (Giambona et al., 2009)(Das & Talukder, 2002).

A heterogeneidade clínica está dependente também dos níveis de Hb F, pois a maior produção de cadeias  $\gamma$  melhoram o quadro clínico, (Breda et al., 2009) (Clarke & Higgins, 2000) (Giambona et al., 2009)(Das & Talukder, 2002) (Galanello & Cao, n.d.),

e da presença de cadeias  $\alpha$  livres (Anexo 11) (Galanello & Origa, 2010) (Patrinos et al., 2005) (Cao et al., 2011).

Os indivíduos com talassémia  $\beta$  apresentam anemia microcítica, níveis de Hb, VGM, HGM reduzidos, e (Galanello & Origa, 2010) (Colah et al., 2007) geralmente apresentam níveis de Hb F e Hb A<sub>2</sub> elevados. Todos estes parâmetros variam consoante a severidade da talassémia (Colah et al., 2007) (Muncie & Campbell, 2009) (Patrinos et al., 2005) (Giambona et al., 2009).

## **OBJECTIVOS**

O principal objectivo deste trabalho foi a identificação e caracterização molecular e funcional de variantes na cadeia  $\beta$  da Hb não descritas na literatura, encontradas no Laboratório de Anemias Congénitas e Hematologia Molecular do Serviço de Hematologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, de modo compreender a correlação entre o genótipo e o fenótipo. Com este trabalho pretendeu-se ainda, embora de forma secundária, a identificação e caracterização molecular de variantes na cadeia  $\beta$  de Hbs descritas na literatura; e a implementação, no laboratório de Hematologia, da metodologia de PCR em tempo real de modo a confirmar o aumento do rácio do mRNA  $\alpha/\beta$  em pacientes com talassémia  $\beta$ , e consequentemente compará-lo com o rácio do mRNA  $\alpha/\beta$  de pacientes com variantes  $\beta$  de Hb. Numa segunda instância, utilizar esta técnica no rastreio de casos anormais de microcitose e hipocromia, principais características de pacientes com talassémias.

## **MÉTODOS e MATERIAIS**

As amostras utilizadas neste estudo eram de indivíduos provenientes das consultas externas de Patologia do Glóbulo Vermelho do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (Portugal), de outros Hospitais nacionais.

Estas amostras foram estudadas no Laboratório de Anemias Congénitas e Hematologia Molecular do Serviço de Hematologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, onde foram realizados estudos bioquímicos e moleculares. Os estudos bioquímicos consistiram na obtenção dos parâmetros hematológicos (Hemograma), e no estudo da Hbs por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) de troca catiónica, por focagem isoeléctrica (IEF) e teste de solubilidade para a pesquisa de Hb S. Os estudos moleculares consistiram na extracção de DNA a partir de sangue periférico em Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA), Reacção de Polimerização em Cadeia (PCR) do gene globínico  $\beta$ , PCR do DNA complementar (cDNA) do gene globínico  $\beta$ , MLPA para o gene  $\beta$  globínico, electroforese em gel de agarose, sequenciação dos produtos de PCR, extracção de RNA a partir de sangue periférico, transcrição reversa do RNA, e obtenção do rácio mRNA  $\alpha/\beta$  através de PCR em tempo real.

Alguns estudos foram realizados na Unidade Microcitémica e Outras Patologias Hematológicas do Hospital Microcitémico, ASL Cagliari (Itália) e consistiram em HPLC das cadeias globínicas e electroforese em acetato de celulose para as Hbs. Foram ainda realizados AUT-PAGE para as cadeias globínicas, SDS-PAGE, cromatografia de exclusão molecular, IEF, testes de estabilidade, e estudos funcionais (curvas de dissociação do O<sub>2</sub>) no Departamento de Ciências da Vida e do Ambiente da Universidade de Cagliari (Itália).

Os dados das etapas de colheita de sangue, obtenção de parâmetros hematológicos, HPLC, e MLPA para o gene globínico  $\beta$  (para a identificação molecular

da Hb Lepore) foram fornecidos. Todas as amostras foram estudadas com sigilo profissional.

## **1. Colheita de sangue**

As amostras de sangue foram colectadas em tubos próprios de EDTA para os estudos realizados no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e no Hospital Microcitémico, ASL Cagliari, e em tubos próprios de heparina para os estudos realizados no Departamento de Ciências da Vida e do Ambiente da Universidade de Cagliari.

## **2. Lavagem dos glóbulos vermelhos e hemólise**

Para a realização da lavagem dos glóbulos vermelhos foi necessário que o sangue fosse recolhido em tubos contendo heparina, de tal modo a impedir a coagulação do sangue. Este foi sujeito a várias lavagens numa solução isotónica de NaCl a 0.9%, mediante centrifugação 10 min a 3000 rpm com uma centrífuga refrigerada Beckman J2-21. As centrifugações permitiram o aceleração do processo de sedimentação e separação do plasma a partir dos eritrócitos. Depois de cada lavagem removeu-se o sobrenadante (plasma), até que este parecesse límpido, livre de todos os vestígios de plasma. Os glóbulos vermelhos hemolisados foram obtidos a frio com H<sub>2</sub>O, e centrifugação durante 20 min a 16 000 rpm. Posteriormente recolhe-se o sobrenadante contendo a hemoglobina (hemolisado).

## **3. Determinação da concentração de Hb**

A determinação da concentração de Hb, a partir de hemolisados ou de hemolisados desprovidos de fosfatos, foi efectuada num espectrofotómetro VARIAN

CARY 50. Primeiramente efectuou-se um branco, depois leu-se a absorvância a 542 nm. A concentração foi efectuada pela resolução da equação de Beer-Lambert ( $A=\lambda lc$ , em que A é a absorvância,  $\lambda$  é o coeficiente de absorção da substância, l é a largura da cuvete, e c é a concentração da amostra). A concentração foi expressa em mg/mL.

#### 4. Obtenção de parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos foram determinados no CELL-DYN Sapphire analyser (Abbott Diagnostics, Illinois, USA). Os parâmetros de referência encontram-se nas Tabela 1 e

Tabela 2.

**Tabela 1 - Valores hematológicos normais de mulheres (>12 anos)**

Eritrócitos ( $10^{12}/L$ )	3,8 – 4,8
Hemoglobina (HGB) [g/dL]	12 - 16
Hematócrito (HTC) [%]	36 - 46
Volume Globular médio (VGM) [fL]	80 - 100
Hemoglobina Globular Média (HGM) [pg]	27 - 32
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHGM) [g/dL]	32 - 35
Reticulócitos	1 - 2

**Tabela 2 – Valores hematológicos normais de homens (>12 anos)**

Eritrócitos ( $10^{12}/L$ )	4,5 – 5,5
Hemoglobina (HGB) [g/dL]	13 – 17,5
Hematócrito (HTC) [%]	40 - 50
Volume Globular médio (VGM) [fL]	80 - 100
Hemoglobina Globular Média (HGM) [pg]	27 - 32
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHGM) [g/dL]	32 - 35

Reticulócitos	1 - 2
---------------	-------

## 5. HPLC

Foi realizado HPLC de troca catiónica para a análise de variantes de Hb, quantificação de Hb A<sub>2</sub> e Hb F através de um HPLC-VARIANT II™, com o β-Thalassemia Short Program (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) (Tabela 3). Os valores de referência na Tabela 4.

**Tabela 3 – Janelas designadas para Bio-Rad Variant II HPLC system.**

Nome do pico	Tempo de retenção, minutos (min)
Janela P1	0.63-0.85
Janela F	0.98-1.20
Janela P2	1.24-1.40
Janela P3	1.40-1.90
Janela A <sub>0</sub>	1.90-3.10
Janela A <sub>2</sub>	3.30-3.90
Janela D	3.90-4.30
Janela S	4.30-4.70
Janela C	4.90-5.30

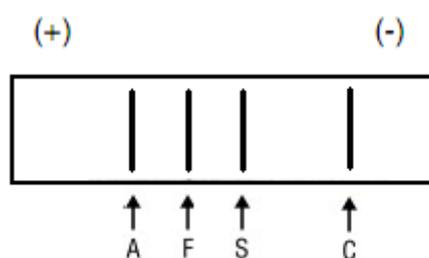
**Tabela 4 – Valores normais de Hbs no HPLC.**

Hb A (%)	> 85
Hb A <sub>2</sub> (%)	2 – 3,5
Hb F (%)	< 1

## 6. IEF

O IEF permitiu a migração das Hbs consoante o seu ponto isoeléctrico, e consequentemente a visualização de bandas correspondentes a variantes de Hb (Figura

6). Para a realização do gel, adicionou-se soluções de acrilamida 30% - bisacrilamida 0.93% (5,85 mL), anfolina (2,352 mL), H<sub>2</sub>O (26,85 mL), persulfato de amônio 40% (48,65 µL) e temed (54,6 µL). As amostras foram previamente preparadas com uma concentração de 8 mg/mL. A corrida de electroforese foi realizada usando uma solução de NaOH 1 M e uma solução de ácido aspártico 40 mM (gama de pH 6.7-7.7). A electroforese foi realizada a 900 V cerca de 2 horas. Após a corrida o gel foi corado com uma solução de coloração, contendo etanol (50%), ácido acético (5%) e bromofenol (0,1%), e de seguida descolorada com uma solução de etanol (30%) e ácido acético (6%).

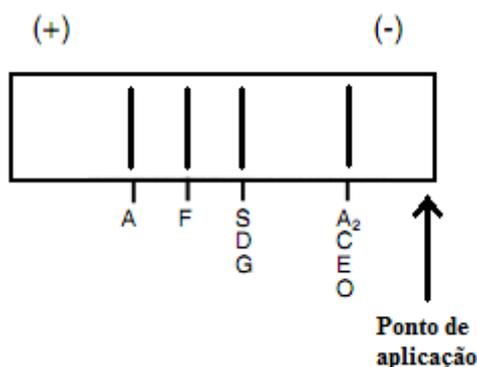


**Figura 6 - Mobilidades electroforéticas de Hbs em IEF.**

## **7. Electroforese em acetato de celulose (pH 8.4)**

A electroforese em acetato de celulose permite avaliar os padrões electroforéticos, de forma qualitativa e semi-quantitativa, da maioria das variantes de Hb e diagnosticar uma gama elevada de síndromes talassémicas. Nesta electroforese, as Hbs separam-se por e carga eléctrica. Para a realização desta técnica é necessário hemolisar o sangue (1 gota) com água destilada (500 µL), anteriormente. Experimentalmente equilibraram-se tiras de acetato de celulose em ácido acético 5%, nas quais se aplicaram as amostras com um aplicador específico, e posteriormente foram colocadas na câmara electroforética contendo Tris-borato 0.08 M pH 8.4. A

corrida electroforética foi feita a 330 V durante 25 min. As Hbs vão migrar do pólo negativo para o pólo positivo (Figura 7). Após a corrida as tiras foram emersas na sonda Red Ponceau, e depois branqueadas, com ácido acético 5%.



**Figura 7 – Mobilidades electroforéticas de Hbs na electroforese em acetato de celulose.**

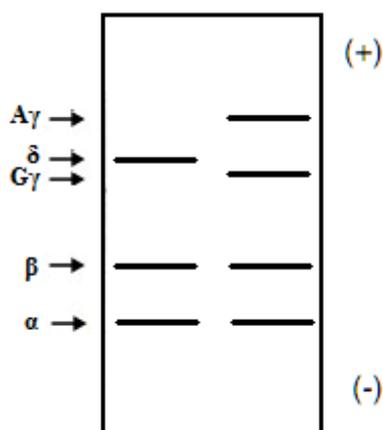
## **8. HPLC de fase reversa das cadeias globínicas**

Foi realizado o HPLC das cadeias globínicas de modo a estudar cadeias globínicas anormais. Esta técnica foi realizada à temperatura ambiente no analisador System Gold (Beckman) usando uma coluna LiChrospher RP8 column. As fases móveis foram preparadas usando acetonitrilo, metanol e cloreto de sódio.

## **9. Electroforese AUT-PAGE**

Através deste método, é possível destacar as cadeias globínicas presentes no hemolisado (Figura 8). A electroforese realizou-se em condições desnaturantes (AUT-PAGE) com ureia 8 M e TRITON-100. As amostras de Hb foram preparadas numa concentração de 1 mg/mL. Efectuou-se o gel com os compostos: ureia 8 M (3,28 g em 6,85 mL de dH<sub>2</sub>O), acrilamida (50%) + bisacrilamida (0,32%) (2,35 mL), ácido acético (0,457 mL), triton X-100 (0,183 mL), riboflavina (0,1217 mL), e temed (0,0365 mL). A polimerização do gel foi realizada por exposição em Ultra Violeta. Os hemolisados

foram diluídos 1:1 com tampão de desnaturação, e incubadas cerca de 35 min. O tampão de desnaturação consistiu numa solução de ureia 8 M (0,6 g em 0,8 mL de dH<sub>2</sub>O), ácido acético (0,1 mL) e β-mercaptoetanol (0,1 mL). Aplicaram-se as amostras e o marcador 'pyronin G no gel, e iniciou-se a electroforese em ácido acético 5% com uma constante de amperagem de 10 mA. Depois da electroforese, colocou-se o gel numa solução de coloração (0,25% de coomassie, metanol 30%, 7% de ácido acético) cerca de 20 min, seguido de várias lavagens com solução de descoloração (metanol a 30%, 7% de ácido acético).



**Figura 8 - Mobilidades electroforéticas das cadeias globínicas por AUT-PAGE.**

## 10. SDS-PAGE

O SDS-PAGE foi realizado de modo a verificar a presença das formas tetramérica e monomérica da hemoglobina. Esta técnica envolve a realização de dois géis, um gel de corrida (inferior) e um gel de estancamento (superior). O gel de corrida é constituído por H<sub>2</sub>O (1,05 mL), acrilamida 29,2% - bisacrilamida 0,8% (2,625 mL), tris-HCl 1 M pH 8.8 (1,25 mL), SDS 10% (50 µL), persulfato de amónio 10% (25 µL), e temed (2,5 mL). Após a polimerização deste gel no equipamento específico de electroforese, aplica-se o gel de estancamento, que é composto por H<sub>2</sub>O (3,05 mL), acrilamida 29,2% - bisacrilamida 0,8% (0,65 mL), tris-HCl 1 M pH 6.8 (1,25 mL), SDS

10% (50 µL), persulfato de amónio 10% (25 µL), e temed (4 µL). As amostras aplicadas no gel foram previamente desnaturadas com uma solução pré preparada contendo H<sub>2</sub>O (4 mL); solução tris-HCl 1 M pH 6.8 (1 mL); glicerol (0,8 mL); SDS 10% (1,6 mL); β-mercaptoetanol (10 mL), blue dibromofenol 0,05% (0,2 mL), para uma diluição final de 1:1. O SDS-PAGE foi realizado em tampão contendo tris (15 g), glicina (72 g) e SDS (5 g) com pH final de 8.3 e volume final de 1 L, a uma voltagem constante de 150V, e o marcador utilizado foi o blue bromofenol. Após a corrida efectuou-se a coloração e descoloração do gel, com as mesmas soluções utilizadas na técnica de AUT-PAGE.

## **11. Teste de solubilidade para a pesquisa de Hb S**

A Hb S, quando reduzida pelo ditionito de sódio, é insolúvel em tampão fosfato de alta molaridade, ao contrário das outras Hbs. A saponina é utilizada neste método, pois abre buracos na membrana da célula de modo que as Hbs solúveis saiam dando cor avermelhada ao tampão, enquanto a Hb S precipita dentro da célula. Para a realização desta técnica, dissolveu-se ditionito de sódio (0,1 g) em tampão fosfato pH 7.1 com saponina a 1% (10 mL). Juntou-se sangue total (50 µL), em EDTA, a 2 mL da solução anterior. Posteriormente agitou-se vigorosamente, incubou-se 5 minutos e centrifugou-se (5 min a 2000 rpm). Se o resultado for negativo o tampão tem cor vermelha intensa podendo estar encimado por um anel quase imperceptível, escuro, que corresponde a outras proteínas precipitadas. Se o resultado for positivo para heterozigotia de Hb S, o tampão tem cor vermelha menos intensa, encimado por um anel grosso de cor castanha escura; para homozigotia de Hb S, a cor do tampão vai desde o amarelo até ao vermelho claro (dependendo dos níveis de Hb F) e o tampão é encimado por um anel grosso, castanho-escuro.

## **12. Extracção de DNA**

O DNA genómico foi extraído a partir de leucócitos do sangue periférico usando o *kit* de extracção de DNA QIAamp® DNA Blood Mini (QIAGEN, Hilden, Germany). Para a sua quantificação e determinação da pureza, determinou-se a razão entre as absorvâncias dos comprimentos de onda a 260 e 280 nm ( $A_{260/280}$ ) e a razão entre as absorvâncias dos comprimentos de onda a 230 e 280 nm ( $A_{230/280}$ ) no NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

## **13. Desleucocitação e preparação de lisados de reticulócitos para a extracção de RNA**

A desleucocitação consistiu na filtração de uma amostra de sangue através de uma mistura de celulosas microcristalinas (resina) diluídas em NaCl 0.9%. Esta mistura permite a retenção de leucócitos e plaquetas, e a passagem dos glóbulos vermelhos devido à sua capacidade de deformabilidade. Para a realização desta técnica foi necessário que as amostras tivessem sido colhidas em menos de 48 horas. Preparou-se uma seringa com lã de algodão e com a resina (4 mL), à qual se adicionou a amostra de sangue total (1-2 mL) e NaCl 0.9%. Recolheu-se a amostra de glóbulos vermelhos e realizaram-se três lavagens dos glóbulos vermelhos, com NaCl 0.9% e centrifugações de 5 min a 3000 rpm, removendo sempre o sobrenadante.

Os lisados de reticulócitos foram realizados recorrendo ao Reagente TRIzol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Primeiramente adicionou-se ao produto de desleucocitação tampão de lise dos glóbulos vermelhos ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  115 mM,  $\text{KHCO}_3$  10 mM, EDTA 0,1 M pH 7.4) (10 mL), e incubou-se 5 min no congelador e 15 min no

frigorífico, de modo a rebentar os glóbulos vermelhos. Centrifugou-se 3 min a 3000 rpm, para sedimentar os reticulócitos e rejeitou-se o sobrenadante. Lavou-se mais duas vezes com tampão de lise dos glóbulos vermelhos. Lavou-se com PBS (3 mL) e centrifugou-se 3 min a 3000 rpm. Rejeitou-se o sobrenadante, adicionou-se 500 µL de TRIzol e agitou-se vigorosamente. Procedeu-se ao armazenamento da amostra a -20°C.

## **14. Extracção de RNA**

A extracção de RNA foi realizada com base no método de Chomczynski. A primeira etapa é a separação de fases: adição de clorofórmio (150 µL) ao *ependorf* com o lisado de reticulócitos, e centrifugação 8 min a 8000 rpm. A segunda etapa consiste na precipitação de RNA: remoção do sobrenadante para um tubo tipo *ependorf*, adição de isopropanol (300 µL), e incubação 20 min a -20°C. A terceira etapa é a lavagem de RNA: centrifugação 8 min a 10600 rpm, rejeição do sobrenadante e adição de etanol 75% (600 µL). Posteriormente centrifugou-se 5 min a 8400 rpm, rejeitou-se a solução deixou-se repousar para secar. A última etapa é a redissolução de RNA, na qual se procedeu à hidratação do produto, por adição de água livre de RNAses (20 µL). A concentração e purificação de RNA foram determinadas pela medição da absorvância a 260 e 280 nm com o NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

## **15. Sequenciação do gene globínico $\beta$**

### **15.1. Amplificação de DNA pelo método PCR**

O PCR teve como principal objectivo obter cópias múltiplas de um fragmento específico do gene globínico  $\beta$ , de modo a conseguir elevadas quantidades de DNA. Os

genes HBB foram selectivamente amplificados por PCR em tubos de PCR 0.2 mL, usando um volume de 25  $\mu$ L, contendo os compostos seguintes: dH<sub>2</sub>O (21  $\mu$ L), Tampão Taq 10x (2,5  $\mu$ L), dNTP's 10 mM (0,5  $\mu$ L), *Primer* Directo 100 ng/ $\mu$ L (0,5  $\mu$ L), *Primer* Reverso 100 ng/ $\mu$ L (0,5  $\mu$ L), Taq DNA Polimerase 5 U/ $\mu$ L (0,1  $\mu$ L), amostra de DNA (2  $\mu$ L). Os *primers* utilizados estão sumariados na Tabela 5.

**Tabela 5 - Resumo das sequências dos *primers* utilizados para a amplificação do gene  $\beta$ .**

Exão	<i>Primers</i>	Sequência oligonucleotídica (5'→3')
1	b1d (Directo)	GAGCCAAGGACAGGTACGG
	b1r (Reverso)	GAGGTTCTTTGAGTCCTTTG
2	b2d (Directo)	AGACTCTTGGGTTTCTGA
	b2r (Reverso)	TAGAATGGGAAACAGACGAATG
3	b3d (Directo)	CAATGTATCATGCCTCTTTGCACC
	b3r (Reverso)	CCATGAAAGAAGGTGAGGCTGC

Os PCRs foram realizados no termociclador Biometra® TPersonal Thermal Cycler (AlphaGen, Iowa, USA). As condições térmicas dos ciclos encontram-se na Tabela 6.

**Tabela 6 - Condições térmicas de amplificação do gene  $\beta$ -globínico.**

Etapas	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 min	1
Desnaturação	95°C	45 s	29
Emparelhamento	65°C	1 min	29
Extensão	72°C	10 min	29
Pausa	4°C	$\infty$	

## 15.2. Amplificação de cDNA pelo método PCR

Este PCR teve como principal objectivo obter cópias múltiplas de um fragmento específico codificante do gene globínico  $\beta$ , de modo a conseguir elevadas quantidades de cDNA. Os genes HBB foram selectivamente amplificados por PCR em tubos de

PCR 0.2 mL, usando um volume de 25  $\mu\text{L}$ , contendo os compostos seguintes:  $\text{dH}_2\text{O}$  (21  $\mu\text{L}$ ), Tampão Taq 10x (2,5  $\mu\text{L}$ ), dNTP's 10 mM (0,5  $\mu\text{L}$ ), *Primer* Directo 100 ng/ $\mu\text{L}$  (0,5  $\mu\text{L}$ ), *Primer* Reverso 100 ng/ $\mu\text{L}$  (0,5  $\mu\text{L}$ ), Taq DNA Polimerase 5 U/ $\mu\text{L}$  (0,1  $\mu\text{L}$ ), amostra de DNA (2  $\mu\text{L}$ ). Os *primers* utilizados estão sumariados na Tabela 7.

**Tabela 7 - Resumo das sequências dos *primers* utilizados para a amplificação do gene  $\beta$ .**

<i>Primers</i>	Sequência oligonucleotídica (5'→3')
Directo	ACATTTGCTTCTGACACAACCTGTG
Reverso	GCCCTTCATAATATCCCCAGTTT

Os PCRs foram realizados no termociclador Biometra® TPersonal Thermal Cycler (AlphaGen, Iowa, USA). As condições térmicas dos ciclos encontram-se na Tabela 8.

**Tabela 8 - Condições térmicas de amplificação do gene  $\beta$ -globínico.**

Etapas	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 min	1
Desnaturação	95°C	45 s	29
Emparelhamento	62°C	1 min	29
Extensão	72°C	10 min	29
Pausa	4°C	$\infty$	

### 15.3. Electroforese em gel de agarose

A electroforese em gel de agarose 2% dos produtos de PCR foi realizada para testar a amplificação por PCR. O gel de agarose consistiu na dissolução, por aquecimento, de 1g de agarose em 50 mL TBE 0.5% (Tris 1,78M; EDTA 0,04M; Ácido Bórico 1,77M), e com a adição de 4  $\mu\text{L}$  de “Syber Safe”. As amostras foram aplicadas (5  $\mu\text{L}$ ) cada uma com uma gota de corante. De seguida iniciou-se a electroforese a 120 V durante cerca de 25 minutos. Como o DNA tem carga negativa a

pH neutro, vai migrar para o pólo positivo (ânodo). Após a corrida de electroforese, visualizou-se o gel com recurso a um equipamento fotográfico específico.

#### 15.4. Purificação dos produtos de PCR com EXOSAP

Foi realizada a purificação dos produtos de PCR com EXOSAP, que faz a digestão dos *primers*, Taq Polimerase, e outros componentes da reacção de PCR excepto do DNA de cadeia dupla. Para tal, adicionou-se 1µL de ExoSap e 4µL de produto de PCR num tubo de PCR 0,2 mL. A purificação depois realizada no termociclador, com as condições térmicas de purificação apresentadas na Tabela 9.

**Tabela 9 - Condições térmicas de purificação do produto de PCR.**

Temperatura	Tempo
37°C	15 min
80°C	15 min

#### 15.5. Reacção de sequenciação e reacção de precipitação pelo Kit Qiagen® (Dye Ex™ 2.0 spin kit)

A reacção de sequenciação dos produtos de PCR purificados realizou-se utilizando o *kit* do BigDye® Terminator v1.1 Cyclor Sequencing (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Este *kit* possui tampão, DNA polimerase, e dNTP's e ddNTP's marcados com 4 fluorocromos diferentes. A reacção de sequenciação consistiu na seguinte mistura: dH<sub>2</sub>O (6,5 µL), BigDye (1 µL), *Primer* directo ou reverso (0,5 µL), produto de PCR purificado (2 µL). A reacção de sequenciação foi realizada no termociclador, utilizando as condições térmicas e cíclicas, apresentadas na Tabela 10.

**Tabela 10 - Condições térmicas de sequenciação do produto de PCR purificado.**

Temperatura	Tempo	Número de ciclos
90°C	20 s	1

60°C	2 min	24
4°C	∞	

De seguida realizou-se a reacção de purificação de modo a remover o BigDye. Para tal aplicou-se o produto de sequenciação em colunas com resinas e centrifugou-se 4 min e 30 s a 3290 rpm. Recolheu-se o produto, que posteriormente foi pipetado para a placa do sequenciador, e analisado pelo Hitachi 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

## 16. Transcrição reversa

A transcrição reversa teve como principal objectivo realizar a síntese de cDNA a partir do RNA total extraído e quantificado. Primeiramente realizou-se a linearização de 1 µg de RNA total num volume total de 25 µL, no termociclador e com as condições apresentadas na Tabela 11.

**Tabela 11 - Condições térmicas da linearização de RNA.**

Temperatura	Tempo	Número de ciclos
90°C	20 s	1
60°C	2 min	24
4°C	∞	

A reacção de transcrição reversa foi efectuada com o *kit* High Capacity cDNA Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), que continha RT Buffer (x10) (5 µL), *primers* d(N)<sub>6</sub> (x10) (5 µL), dNTP's (100 mM) (2 µL), Transcriptase reversa MultiScribe RT (500/µL) (2,5 µL). Para além do *kit* foi adicionada dH<sub>2</sub>O (10,5 µL) e RNA (25 µL) para um volume total de 50 µL. Colocou-se no termociclador e iniciou-se o programa de cDNA, descrito na Tabela 12.

**Tabela 12 - Condições térmicas de reacção de transcriptase reversa.**

Temperatura	Tempo
25°C	20 s
37°C	59 min e 59 s
85°C	5 min
4°C	∞

## **17. PCR em tempo real quantitativo**

O PCR em tempo real quantitativo teve como principal objectivo a amplificação, detecção e quantificação de mRNA das cadeias globínicas numa única etapa. Para a implementação desta metodologia foi primeiramente executado um estudo em indivíduos hematologicamente normais com o intuito de avaliar a fiabilidade desta metodologia, e em indivíduos com fenótipo e genótipo talassémico  $\beta$  conhecido de algumas mutações, com a finalidade de comprovar a capacidade da metodologia na obtenção do rácio do mRNA  $\alpha/\beta$ .

No PCR em tempo real utilizou-se um volume de 25  $\mu\text{L}$  contendo 100 ng de cDNA (5  $\mu\text{L}$ ), 100 nM de cada *primer* (0,4  $\mu\text{L}$ ), 60 nM de cada sonda (0,12  $\mu\text{L}$ ), 12,5  $\mu\text{L}$  de TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem, Branchburg, NJ, USA) e dH<sub>2</sub>O (6,46  $\mu\text{L}$ ). As concentrações apresentadas foram optimizadas de modo a obter o máximo de rendimento e fidelidade. O ensaio quantitativo de PCR em tempo real dos transcritos foi efectuado com recurso a sondas específicas duplas marcadas fluorescentemente num 7300 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A 6-carboxi fluoresceína (FAM) foi usada como repórter fluorescente, enquanto que adicionámos tetrametilrodamina (TAMRA) como quencher para o gene  $\beta$ .

Para o gene  $\alpha$ , as sondas foram marcadas fluorescentemente com VIC<sup>TM</sup>. As sequências dos *primers* e das sondas que foram usados são: *primer* directo da cadeia  $\alpha$ , 5' CACGCTGGCGAGTATGGT 3'; *primer* reverso da cadeia  $\alpha$ , 5' ACCAAGACCTACTTCCCGC 3'; sonda da cadeia  $\alpha$ , 5' VIC-CCTGGAGAGGATGTTCC 3'; *primer* directo da cadeia  $\beta$ , 5' GGTGAACGTGGATGAAGTTGGT 3'; *primer* reverso da cadeia  $\beta$ , 5' TCTACCCTTGGACCCAGAGG 3'; sonda da cadeia  $\beta$ , 5' FAM-CTGGGCAGGCTGCTGGT-TAMRA 3', como descrito por So et al. 2006. Todas as sondas foram desenhadas para abranger as junções entre os exões de modo a prevenir a amplificação de qualquer possível contaminação genómica de DNA (R. D. Smith et al. 2000). O GAPDH humano (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi usado como controlo endógeno e gene de referência. As condições térmicas dos ciclos compreendiam uma etapa de aquecimento inicial a 50°C durante 2 min, uma etapa de desnaturação a 95°C durante 10 min e 40 ciclos de 15 s a 95°C para desnaturação seguida de uma etapa de emparelhamento a 55°C durante 1 min. Estas condições foram optimizadas de modo a obter maior fiabilidade da técnica. Os ensaios foram realizados em duplicado para cada amostra. Os valores quantitativos foram obtidos pelo número de ciclo limiar (*threshold*) em que o aumento do sinal associado com o crescimento exponencial dos produtos de PCR foi detectado pelo 7300 Systems SDS Software. O *threshold* para cada cadeia globínica e para o GAPDH foi obtida através de diluições seriadas com amostras de indivíduos normais. A eficiência das reacções foi determinada através das curvas *standart* para o cDNA do  $\alpha$ ,  $\beta$ , GAPDH. O rácio entre a expressão dos genes globínicos  $\alpha$  e  $\beta$  foi computadorizado através do REST 2009 Software.

## 18. Estudo da estabilidade

O teste de estabilidade permitiu verificar se uma variante de Hb era instável ou não. Este teste consistiu em colocar uma solução de Tris (12,11g) e isopropanol a 17% numa proveta e incubar a 37°C durante 10 min. Adicionou-se a esta hemolisado de sangue previamente preparado e agitou-se ligeiramente. Colocou-se novamente a incubar a 37°C durante 30 min. Posteriormente verificou-se se a solução estava límpida (teste negativo) ou havia precipitado (teste positivo).

## **19. Cromatografia de exclusão molecular**

Esta técnica permitiu a obtenção de hemoglobina desprovida de fosfatos orgânicos (2,3-DPG) e iões cloro. Utilizou-se uma coluna cromatográfica SEPHADEX G-25 equilibrada com tampão tris 10mM + NaCl 0.1M pH 8. Os fosfatos orgânicos ficam retidos na coluna e recolheu-se a Hb. Este produto foi posteriormente utilizado para os estudos funcionais.

## **20. Estudos funcionais – Medição da afinidade ao oxigénio**

O estudo da dependência de pH na afinidade ao oxigénio é uma ferramenta sensível para investigar a relação estrutura-função na Hb. A afinidade de ligação para o oxigénio, expressa em termos de  $\log p_{50}$  foi calculada à temperatura de 37°C, na presença e na ausência de 2,3-DPG 5 mM, e a vários pHs. A concentração da amostra utilizada foi de cerca de 1 mg/mL. Os tampões utilizados para os testes foram tris 0.1 M NaCl 0.1 M ou Bis-Tris 0.1 M NaCl 0.1 M. Estes testes foram realizados no espectrofotómetro VARIAN CARY 50. Para tal preparou-se a solução de Hb com amostra resultante da cromatografia de exclusão molecular e com um dos tampões acima referidos, para um volume final de 3 mL, e uma concentração final de Hb entre 1-1,2 mg/mL. Mediu-se a concentração da amostra e o pH inicial. De seguida procedeu-se

à desoxigenação da solução através de um sistema de vácuo e equilibrou-se a solução num banho a temperatura estável de 37°C, durante 5 min. Registou-se as absorvâncias de 576, 555 e 542 nm. Adicionaram-se quantidades conhecidas de O<sub>2</sub>, equilibrou-se no banho 5 min depois de cada adição e registaram-se as absorvâncias referidas anteriormente. Após várias adições de oxigénio, procedeu-se à completa oxigenação da solução da amostra através de um cilindro de O<sub>2</sub>. Mediu-se o volume final e o pH final.

## 21. Análise *in silico*

Os programas de *software* que foram usados para prever o impacto de novas variantes na estrutura e função da molécula de Hb: PolyPhen-2, uma ferramenta que prevê possíveis consequências de uma substituição de aminoácido na estrutura e função de proteínas humanas; SIFT, que prevê se uma substituição de aminoácido afecta a função da proteína baseada no grau de conservação dos resíduos de aminoácidos num alinhamento de sequências derivados de sequências estreitamente relacionadas, e os SIFT foram classificados como tolerante (0.201–1.00), intolerante (0.051–0.10), ou *borderline* (0.101–0.20); Project HOPE, que analisa os efeitos estruturais causados por uma mutação (George Priya Doss & Rao, 2009)(Venselaar, Te Beek, Kuipers, Hekkelman, & Vriend, 2010)(Alanazi et al., 2011).

Foram ainda realizadas *Modelling Dynamics simulations (MD simulations)* de forma a prever possíveis consequências de uma mutação na estrutura da Hb, mais precisamente da mutação CD142 (GCC>TTC). Para tal, preparou-se o modelo Hb A a partir da estrutura 2DN2 de alta resolução de raios-X, a 1,25 Å, na forma desoxi. A protonação de histidinas foi realizada seguindo trabalhos anteriores (Ceccarelli et al., 2006). Solvatou-se o tetrâmero adicionando 15035 moléculas de água numa caixa cúbica de dimensão 93,578 Å. Após minimização, aqueceu-se o sistema no conjunto

NPT durante 1 nanosegundo a partir de restrições harmônicas aplicadas de 10 a 300 K nas coordenadas de todos os carbonos  $\alpha$ . Durante esta parte foi utilizado o programa NAMD (versão 2.9). Em seguida, com o programa ACEMD (Harvey, Giupponi, & Fabritiis, 2009) foram aplicados 20 nanosegundos ao conjunto NPT, seguido por 100 ns no conjunto NVT com restrições. Terminou-se com 20 ns no NPT, sem restrições, com a caixa de final de tamanho 82,4 Å. Empregou-se o campo de força amber99SB-ildn para a proteína (Lindorff-Larsen, Piana, Palmo, Maragakis, & Klepeis, 2010), o campo de força âmbar para o heme usando os parâmetros "HARD" a partir de (Henry, Levitt, & Eaton, 1985) para a forma desoxi, e o TIP3P para a água (Jorgensen, Chandrasekhar, Madura, Impey, & Klein, 1983). A partir da última estrutura começou-se duas MD simulações de 100 nanosegundos para a Hb A *WildType* e variante de Hb, respectivamente. A mutação foi obtida por substituição de Ala-142 para Phe numa cadeia globínica  $\beta$ . As análises foram realizadas nos últimos 100 nanosegundos de cada simulação. O desvio de todo o tetrâmero a partir da estrutura inicial de raios-X não ultrapassava 1,8 Å.

## **RESULTADOS**

No laboratório do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra foram encontradas várias variantes na cadeia globínica  $\beta$  da Hb, descritas e não descritas na literatura. As variantes descritas são Hb Köln, Hb Leiden, Hb Saint Louis, Hb Shepherds Bush, Hb Malmö, Hb Vila Real, Hb San Diego, Hb S, Hb C, Hb D-Punjab, Hb E, Hb Lepore-Boston-Washington, Hb N-Baltimore, Hb Aix les Bains. As variantes não descritas são CD 142 GCC-TTC e Hb Ponta Delgada.

### ***1. Indivíduo 1***

De modo identificar uma variante de Hb foi realizada a sequenciação de DNA dos genes da cadeia globínica  $\beta$ , que revelou uma transição G $\rightarrow$ A que dava origem a uma substituição de aminoácido Val $\rightarrow$ Met no codão 98 (c.295G>A; pVal99Met, de acordo com HGVD). O indivíduo 1 era heterozigótico para a variante Hb Köln.

Os testes *in silico* revelaram que esta mutação podia afectar a função da proteína (SIFT score 0.00), e resultar em danos para a molécula provavelmente através do rompimento de um local de ligação (difference score PSIC 1,000). O teste no Project Hope revelou que o resíduo original (valina), localizado no núcleo da Hb, é muito conservado, no entanto têm-se verificado outros aminoácidos na posição afectada. O resíduo mutante (metionina) é maior do que o resíduo original, logo o resíduo mutante poderá ser demasiado grande para ocupar a posição ocupada pelo resíduo original (Figura 9). As diferenças entre o resíduo original e o resíduo mutante podem levar a perturbações na estrutura do núcleo do domínio e assim afectar a ligação do anel tetrapirrólico.

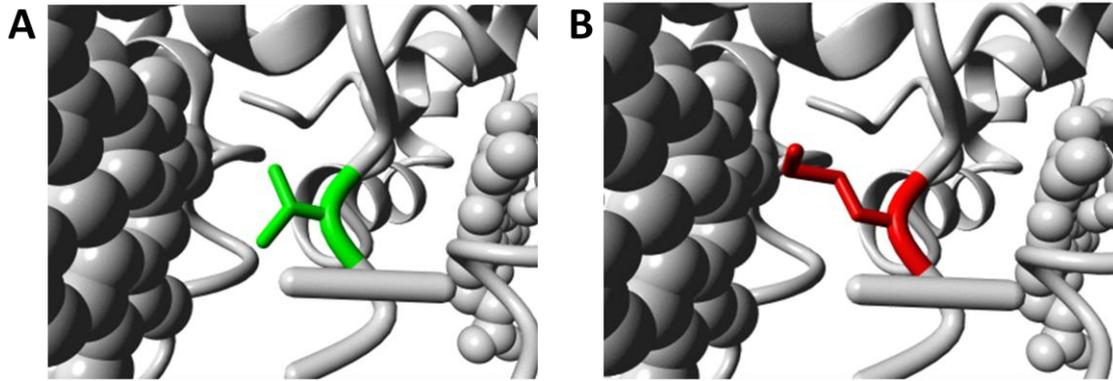


Figura 9 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.295G> A; pVal99Met (Hb Köln). (A) Resíduo original (Valina); (B) Resíduo mutante (Metionina).

## 2. Indivíduo 2

De modo identificar uma variante de Hb foi realizada a sequenciação de DNA dos genes da cadeia globínica  $\beta$ , que revelou deleção GAG dando origem à deleção do resíduo de glutamato no codão 6 ou 7 da cadeia globínica  $\beta$  (c.22\_24delGAG; pGlu6/7Stop, de acordo com HGVD) (Figura 10). O indivíduo 2 era heterozigótico para a variante Hb Leiden.

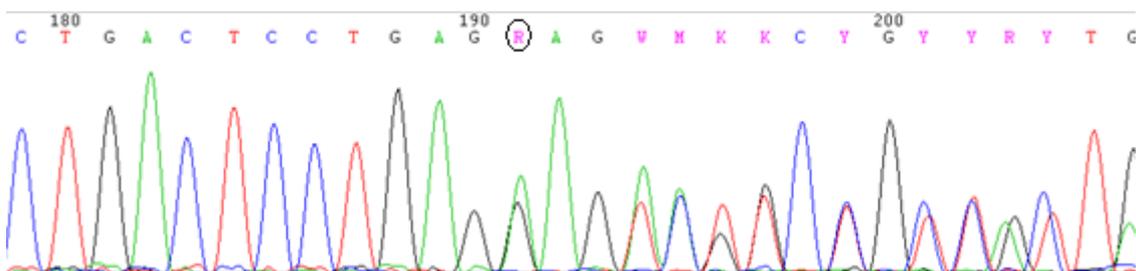
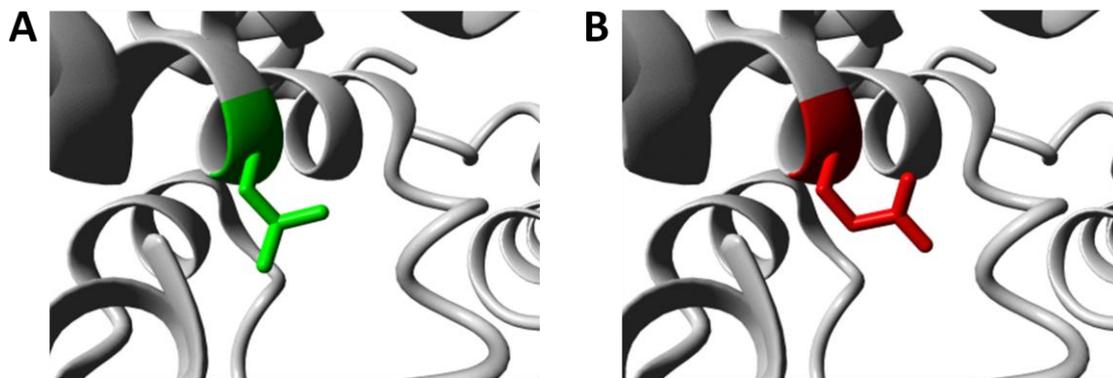


Figura 10 - Sequência de DNA de um fragmento do exão 1 de HBB mostrando a mutação c.22\_24delGAG; pGlu6/7Stop.

## 3. Indivíduo 3

De modo identificar uma variante de Hb foi realizada a sequenciação de DNA dos genes da cadeia globínica  $\beta$ , que revelou uma transição  $T \rightarrow A$  dando origem a uma substituição de aminoácido  $Gln \rightarrow Leu$  no codão 28 da cadeia globínica  $\beta$  (c.86T>A; pLeu29Gln, de acordo com HGVD). O indivíduo era heterozigótico para a variante Hb Saint Louis.

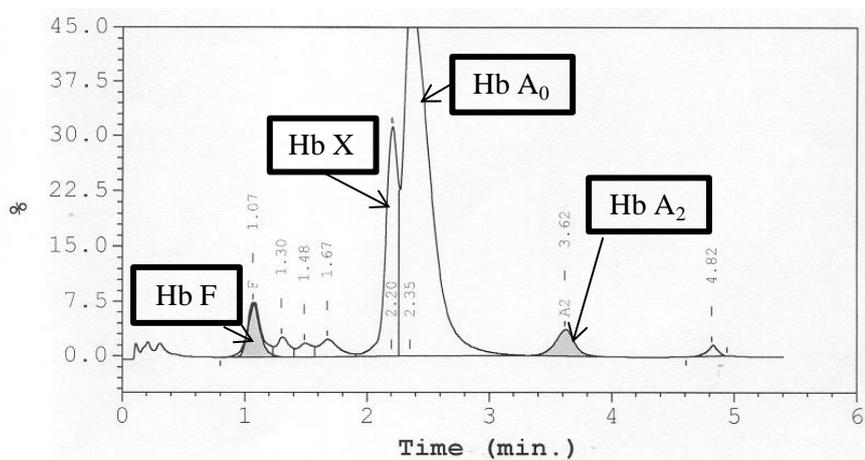
Por análise *in silico*, foi previsto que a mutação podia afectar a função da proteína (SIFT score 0,00), e resultar em danos prováveis na estrutura da proteína (PSIC difference score 1,000). Através do teste no Project Hope, verificou-se que o resíduo original (leucina) e o resíduo mutante (glutamina) diferem em tamanho e hidrofobicidade. O resíduo mutante é maior que o original, e este é mais hidrofóbico que o resíduo mutante (Figura 11). A mutação causa a perda de interacções hidrofóbicas no núcleo da proteína. Desta forma, as diferenças entre resíduos original e mutante podem perturbar a estrutura do núcleo do domínio e assim afectar a ligação dos iões ferro.



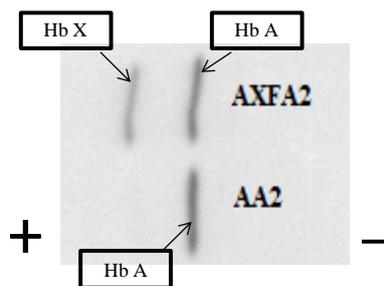
**Figura 11 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.86T> A; pLeu29Gln (Hb Saint Louis). (A) Resíduo original (Leucina); (B) Resíduo mutante (Glutamina).**

#### **4. Indivíduo 4**

A análise da composição e quantificação de Hbs por HPLC de uma amostra de sangue do indivíduo 4 foi realizada, e revelou níveis de Hb A<sub>2</sub> ligeiramente elevados e de Hb F aumentados, e verificou-se um pico anormal antes do tempo de retenção correspondente à Hb A (Figura 12). A análise da composição de Hbs e mobilidade electroforética foi realizada por IEF e revelou uma banda anormal (Figura 13), com mobilidade electroforética distinta da Hb A. Os resultados do HPLC e da IEF levaram à suspeita da presença de uma variante de Hb. De modo a confirmar estes resultados realizou-se a sequenciação de DNA dos genes globínicos β, que revelou uma transição G→A dando origem a uma substituição de aminoácido Gly→Asp no codão 74 da cadeia globínica β (c.224G> A; pGly75Asp, de acordo com HGVD). Esta mutação encontrava-se na forma heterozigótica e correspondia à variante Hb Shepherds Bush. Os dados estão sumarizados na Tabela 13.



**Figura 12 - HPLC de uma amostra de sangue do indivíduo 4. No gráfico é perceptível a visualização de quatro eluições de Hbs referentes a Hb F, Hb X, Hb A<sub>0</sub> e Hb A<sub>2</sub>.**



**Figura 13 - IEF de um hemolisado do indivíduo 4. A parte superior corresponde à amostra do indivíduo 4, a inferior é um controlo normal.**

**Tabela 13 - Parâmetros do estudo das Hbs do indivíduo 4.**

Parâmetros	
Hb A <sub>2</sub> (%)	3.6
Hb F (%)	5.1
Hb A (%)	66.3
X (%)	19.1
Perfil HPLC	AX
Perfil IEF	AXFA2

Por análise *in silico*, foi previsto que esta mutação afectava a função da proteína (SIFT score 0,00), e resultar em danos para a molécula provavelmente devido à mudança de hidrofobicidade do local interno (PSIC score difference 0,972). O Project Hope revelou que o resíduo original (Glicina), que está localizado internamente, e o resíduo mutante (ácido aspártico) diferem no tamanho e na carga (Figura 14). O resíduo mutante é maior que o resíduo original, e os ângulos de torção do resíduo mutante são mínimos, enquanto que a glicina é flexível o suficiente para realizar ângulos de torção. Desta forma, a mutação vai forçar o local a ter uma conformação incorrecta e a perturbar a estrutura local. Esta característica de flexibilidade pode ser necessária para a função da proteína. Em termos de carga, o resíduo original é neutro e o mutante é carregado negativamente, o que pode resultar em problemas de enrolamento da proteína

e portanto é prejudicial para esta. Além disso, as diferenças entre os resíduos glicina e ácido aspártico podem perturbar a estrutura interna da proteína e assim afectar a ligação dos iões ferro.

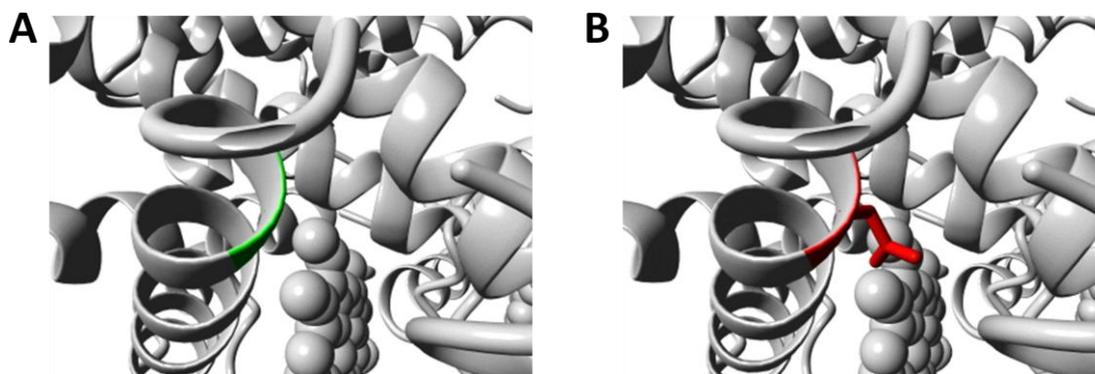
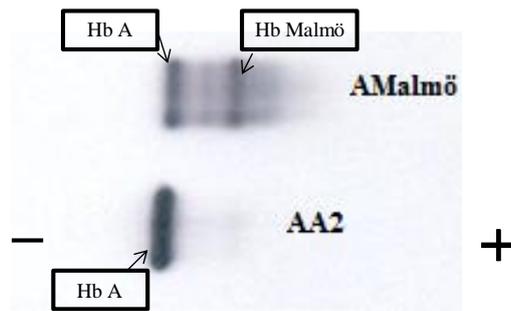


Figura 14 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.224G> A; pGly75Asp (Hb Shepherds Bush). (A) Resíduo original (Glicina); (B) Resíduo mutante (Ácido Aspártico).

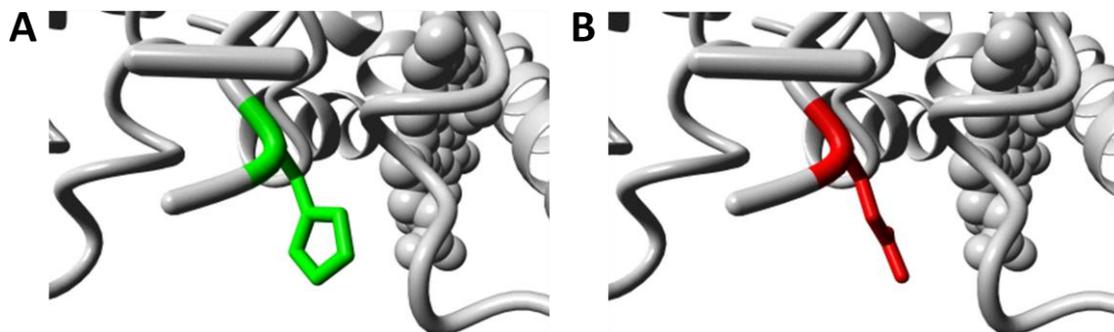
## 5. *Indivíduo 5*

A análise da composição de hemoglobina e mobilidade electroforética de uma amostra do indivíduo 5 foi realizada por IEF e revelou uma banda anormal com mobilidade electroforética característica da Hb Malmö (Figura 15) e uma banda correspondente à Hb A. De modo a confirmar a suspeita da presença de Hb Malmö evidenciada pela IEF realizou-se a sequenciação de DNA do gene globínico  $\beta$ , que revelou uma transição C→A ou C→G dando origem a uma substituição de aminoácido His→Gln no codão 97 da cadeia globínica  $\beta$  (c. [294C>A ou 294C>G]; pHis98Gln, de acordo com HGVD). A sequenciação confirmou a presença de Hb Malmö na forma heterozigótica.



**Figura 15 - IEF do indivíduo 5. A parte superior corresponde à amostra do indivíduo 5 e a parte superior a uma amostra controlo normal.**

Por análise *in silico*, previu-se que esta mutação afecta a função da proteína (SIFT score 0,02), e resultar em danos para a molécula provavelmente pelo contacto com o local funcional (PSIC difference score 0,989). O Project Hope revelou que o resíduo original (histidina) e o resíduo mutante (glutamina) diferem no tamanho, sendo que este último é menor do que o resíduo original (Figura 16). Deste modo, o resíduo mutante pode ser demasiado pequeno para realizar contactos multiméricos, logo causar uma possível perda de interacções externas. Estas diferenças entre resíduo original e mutante podem perturbar a superfície de interacção e, assim, afectar a ligação de iões ferro.



**Figura 16 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c. [294C> A ou 294C>G]; pHis98Gln (Hb Malmö). (A) Resíduo original (Histidina); (B) Resíduo mutante (Glutamina).**

## 6. Indivíduo 6

A análise das Hbs por HPLC do indivíduo 6 foi realizada, e revelou níveis de Hb F dentro dos parâmetros normais, de Hb A<sub>2</sub> ligeiramente aumentados e um pico no mesmo tempo de retenção de Hb A<sub>2</sub> (Figura 17). A análise da composição de hemoglobina e mobilidade electroforética foi realizada por IEF, na qual não foi possível destacar nenhuma banda característica de variante de Hb (Figura 18). De modo a confirmar a suspeita da presença de variante de Hb evidenciada pelo resultado do HPLC realizou-se a sequenciação de DNA do gene globínico  $\beta$ , que revelou uma transição C→A dando origem a uma substituição Pro→His no codão 36 da cadeia globínica  $\beta$  (c110C> A; pPro37His, de acordo com HGVD). Esta mutação caracteriza a Hb Vila Real e encontrava-se na forma heterozigótica. Os dados estão sumarizados na Tabela 14.

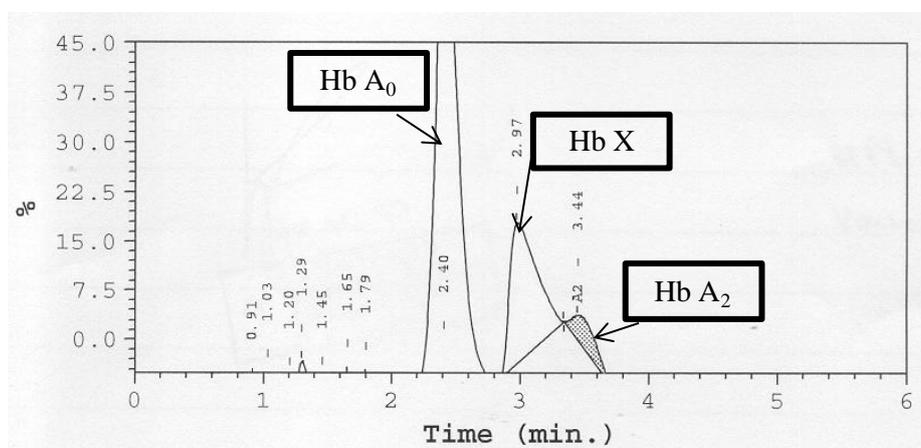
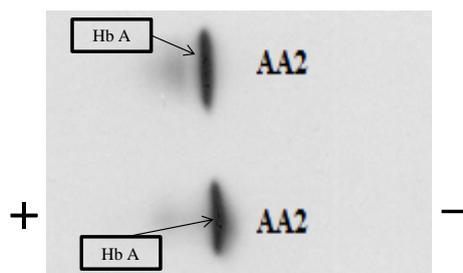


Figura 17 - HPLC de uma amostra de sangue do indivíduo 6. No gráfico é perceptível a visualização de três eluições de Hbs referentes a Hb X, Hb A<sub>0</sub> e Hb A<sub>2</sub>.



**Figura 18 - IEF de um hemolisado do indivíduo 6. A parte superior corresponde à amostra do indivíduo 6 e a parte inferior a uma amostra controlo normal.**

**Tabela 14 - Parâmetros do estudo das Hbs do indivíduo 6.**

Parâmetros	
Hb A <sub>2</sub> (%)	3.7
Hb F (%)	0.7
A0 (%)	65.7
X (%)	22.0
Perfil HPLC	AXA2
Perfil IEF	AA2

Por análise *in silico* foi previsto que esta mutação pode afectar a função da proteína (SIFT score 0,00), e resultar em danos para a molécula provavelmente pelo contacto com o local funcional (PSIC difference score 1,000). O Project Hope revelou que o resíduo original (Prolina) é um dos resíduos invariáveis da cadeia globínica  $\beta$  e que qualquer mutação que envolva este resíduo é geralmente prejudicial para a proteína. O resíduo original e o resíduo mutante (histidina) diferem no tamanho e na hidrofobicidade (Figura 19). O resíduo mutante é maior que o resíduo original e por sua vez este último é mais hidrofóbico, e está envolvido num contacto multimérico. Em determinados casos a hidrofobicidade é importante para a multimerização, logo o resíduo mutante pode afectar esta característica. As diferenças entre os resíduos original e mutante podem levar a perturbações na superfície de interacção e, assim, afectar a ligação dos iões ferro.

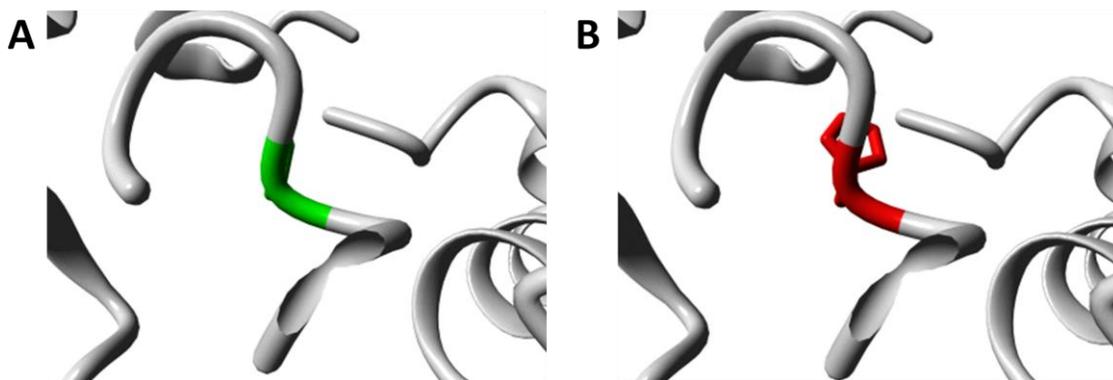


Figura 19 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.110C> A; pPro37His (Hb Vila Real). (A) Resíduo original (Prolina); (B) Resíduo mutante (Histidina).

## 7. Indivíduo 7

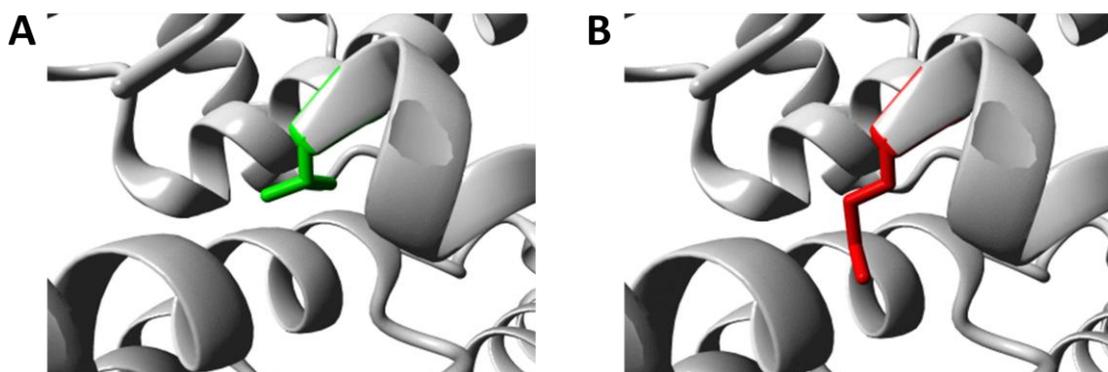
A análise das Hbs por HPLC do indivíduo 7 foi realizada, e revelou níveis de Hb A<sub>0</sub> baixos e um pico elevado antes do tempo de retenção da Hb A<sub>0</sub>. Devido à eluição deste pico suspeitou-se que uma variante de Hb estaria presente. Para confirmar esta suspeita realizou-se a sequenciação de DNA dos genes globínicos β, que revelou uma transição G→A dando origem a uma substituição de aminoácido Val→Met no codão 109 da cadeia globínica β (c.328G>A; pVal110Met, de acordo com HGVD). Esta mutação encontrava-se na forma heterozigótica e correspondia à Hb San Diego. Os dados estão sumarizados na Tabela 15.

Tabela 15 - Parâmetros do estudo das Hbs do indivíduo 7.

Parâmetros	
A0 (%)	43.7
P3 (%)	43.9
Perfil HPLC	AX

Por análise *in silico*, previu-se que esta mutação podia afetar a função da proteína (SIFT score 0,00), e resultar em danos para a molécula provavelmente através

do rompimento de um local de ligação (PSIC difference score 1,000). O teste do Project Hope revelou que o resíduo original (valina) não é conservado na posição em questão, e que está localizado no interior da proteína. O resíduo original difere do resíduo mutante (metionina) no tamanho, sendo que este último é maior e portanto poderá não caber no mesmo local (Figura 20). Desta forma as diferenças entre os dois resíduos podem levar ao distúrbio da estrutura interna da proteína.

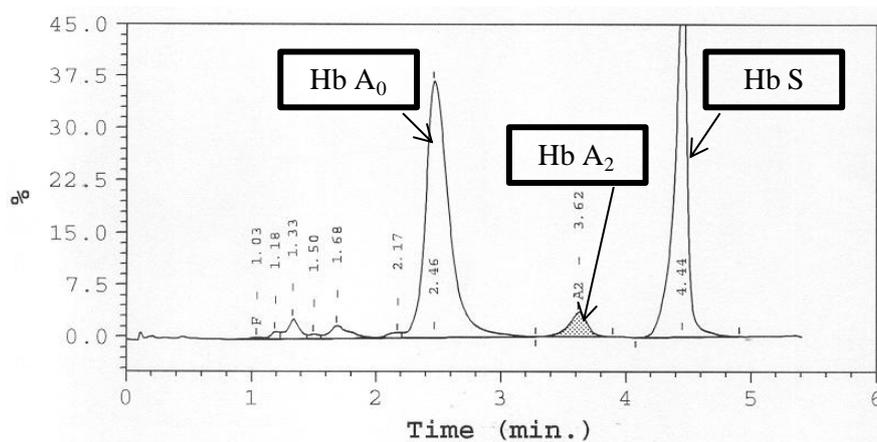


**Figura 20 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.328G>A; pVal110Met (Hb San Diego).**

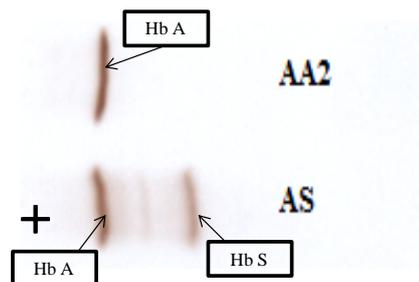
## **8. Indivíduos 8 e 9**

Os parâmetros hematológicos do indivíduo 8 foram obtidos, e revelaram-se normais. A análise da hemoglobina em HPLC revelou níveis de Hb A2 e Hb F normais e um pico com tempo de retenção correspondente à Hb S (Figura 21). A análise da composição de hemoglobina e mobilidade electroforética foi realizada por IEF e revelou duas bandas, uma correspondente à Hb A e outra com mobilidade electroforética característica de Hb S (Figura 22). O teste de solubilidade foi positivo para Hb S em heterozigotia. Estes resultados pressupunham a presença de Hb S em heterozigotia, por isso realizou-se a sequenciação do DNA do gene globínico  $\beta$ , que revelou uma transição A→T dando origem a uma substituição de aminoácido Val→Glu no codão 6 da cadeia

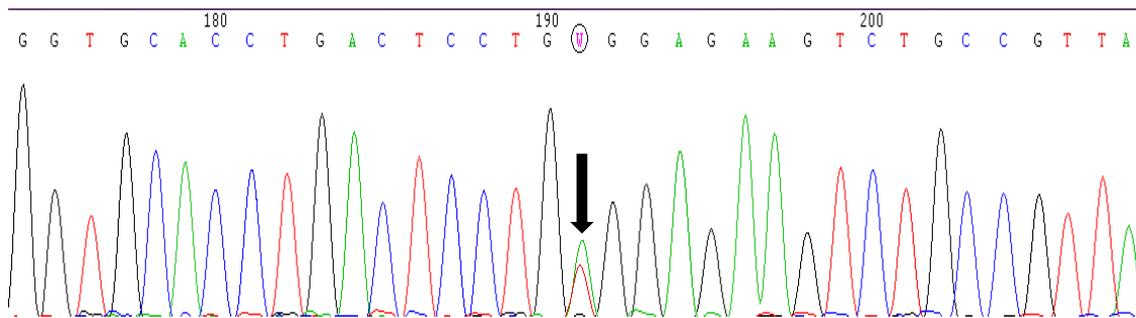
globínica  $\beta$  (c.20A>T; pGlu7Val, de acordo com HGVD) (Figura 23). Este resultado confirmou a presença de Hb S em heterozigotia. Foi realizado PCR em tempo real, cujos resultados foram tratados pelo programa REST 2009, e revelaram um rácio mRNA  $\alpha/\beta$  de 0,71. Os dados estão sumarizados na Tabela 16.



**Figura 21 - HPLC de uma amostra de sangue do indivíduo 8. No gráfico é perceptível a visualização de três eluições de Hbs referentes a Hb A<sub>0</sub> e Hb A<sub>2</sub>, e Hb S.**



**Figura 22 - IEF de um hemolisado do indivíduo 8. A parte inferior corresponde à amostra do indivíduo 8 e a parte superior a uma amostra controlo normal.**



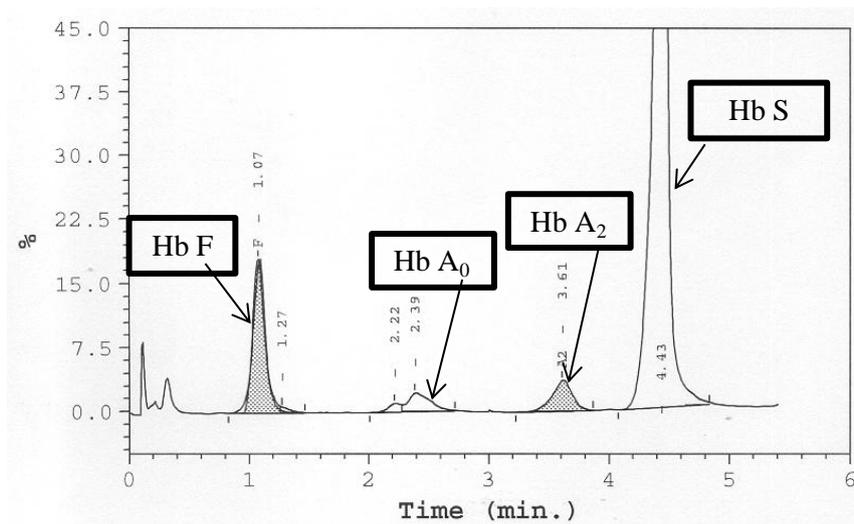
**Figura 23 - Sequência de DNA de um fragmento do exão 1 de HBB mostrando a mutação c.20A>T; pGlu7Val, em heterozigotia.**

**Tabela 16 - Parâmetros hematológicos e moleculares do indivíduo 8.**

Parâmetros	
Gênero/Idade	Masculino/28
Rácio mRNA $\alpha/\beta$	0.71
HGB (g/dL)	13,1
VGM (fL)	78,8
HGM (pg)	27,7
Reticulócitos	2,07
Hb A <sub>2</sub> (%)	3.5
Hb F (%)	0.2
A0 (%)	50.3
Hb S (%)	39.6
Perfil HPLC	AS

Os parâmetros hematológicos do indivíduo 9 foram obtidos e revelaram níveis de HGB abaixo dos valores de referência, e de reticulócitos aumentados. A análise das Hbs em HPLC evidenciou níveis de Hb A<sub>2</sub> ligeiramente aumentados, de Hb F elevados, e verificou-se um pico elevado no tempo de retenção correspondente a Hb S (Figura 24). A análise da composição de hemoglobina e mobilidade electroforética foi realizada

por IEF, que revelou duas bandas com mobilidades electroforéticas correspondentes a Hb S e Hb F (Figura 25). O teste de solubilidade foi positivo para Hb S em homozigotia. De modo a comprovar as suspeitas da presença de Hb S em homozigotia, levantadas pelos resultados anteriores, realizou-se a sequenciação do DNA do gene globínico  $\beta$ , que revelou uma transição A→T dando origem a uma substituição Val→Glu no codão 6 da cadeia globínica  $\beta$  (c.20A> T; pGlu7Val, de acordo com HGVD). Assim confirmou-se que o indivíduo sofria de drepanocitose, ou seja, possuía a mutação da variante Hb S na forma homozigótica. Através dos resultados do PCR em tempo real tratados no REST 2009, foi possível obter o rácio mRNA  $\alpha/\beta$  do indivíduo 9, que foi de 0,69. Os dados estão sumarizados na Tabela 17.



**Figura 24 - HPLC de uma amostra de sangue do indivíduo 9. No gráfico é perceptível a visualização de quatro eluições de Hbs referentes a Hb F, Hb A<sub>0</sub> e Hb A<sub>2</sub> e Hb S.**

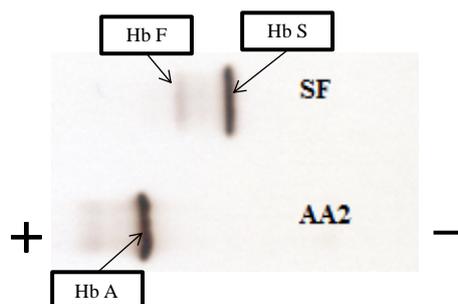


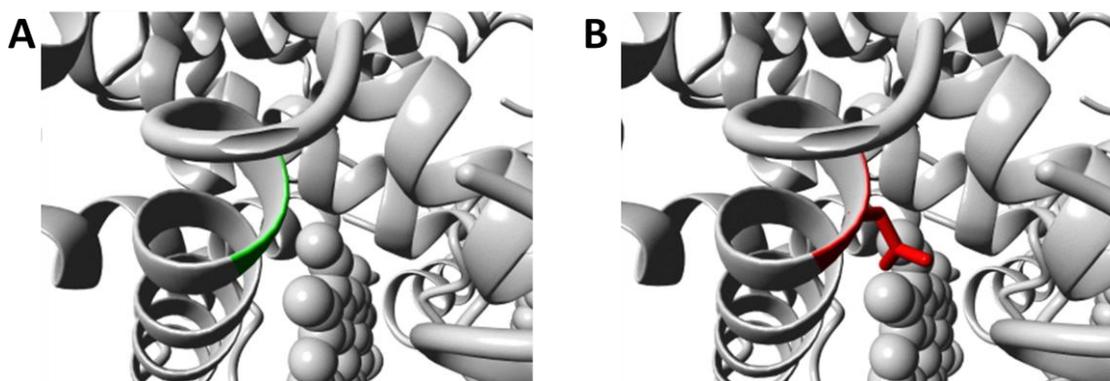
Figura 25 - IEF de um hemolisado do indivíduo 9. A parte superior corresponde à amostra do indivíduo 9 e a parte inferior a uma amostra controlo normal.

Tabela 17 - Parâmetros hematológicos e moleculares do indivíduo 9.

Parâmetros	
Género/Idade	Feminino/8
Rácio mRNA $\alpha/\beta$	0.69
HGB (g/dL)	9,6
VGM (fL)	81,1
HGM (pg)	29,2
Reticulócitos	8,77
Hb A <sub>2</sub> (%)	3.7
Hb F (%)	17.4
Hb S	76.0
Perfil HPLC	SF

Por análise *in silico*, verificou-se que esta mutação podia afectar a função da proteína (SIFT score 0,447), e resultar possivelmente em danos para a molécula (PSIC difference score 0,989). O Project Hope revelou que o resíduo original (Glutamato) e o resíduo mutante (Valina) diferem na carga, tamanho e hidrofobicidade (Figura 26). O resíduo mutante é menor do que o resíduo original. Este é carregado negativamente, enquanto que o resíduo mutante é neutro, e é mais hidrofóbico. As diferenças entre os

resíduos original e mutante podem levar à perturbação da superfície de interação e assim afectar a ligação de iões de ferro.



**Figura 26 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.110C> A; pPro37His (Hb S). (A) Resíduo original (Glutamato); (B) Resíduo mutante (Valina).**

### **9. Indivíduo 10**

A análise das Hbs por HPLC do indivíduo 10 foi realizada, e revelou níveis de Hb A<sub>2</sub> e Hb F normais, e um pico com tempo de retenção correspondente à Hb C (Figura 27). A análise da composição de Hbs e mobilidade electroforética foi realizada por IEF, que revelou duas bandas, uma característica de Hb e outra Hb C (Figura 28). De forma a confirmar a suspeita de Hb C evidenciada pelos resultados do HPLC e IEF realizou-se a sequenciação de DNA dos genes globínicos  $\beta$ , que revelou uma transição G→A dando origem a uma substituição de aminoácido Glu→Lys no codão 6 da cadeia globínica  $\beta$  (c.19G> A; pGlu7Lys, de acordo com HGVD). Este resultado confirmou a suspeita da presença de Hb C na forma heterozigótica. Os dados estão sumarizados na Tabela 18.

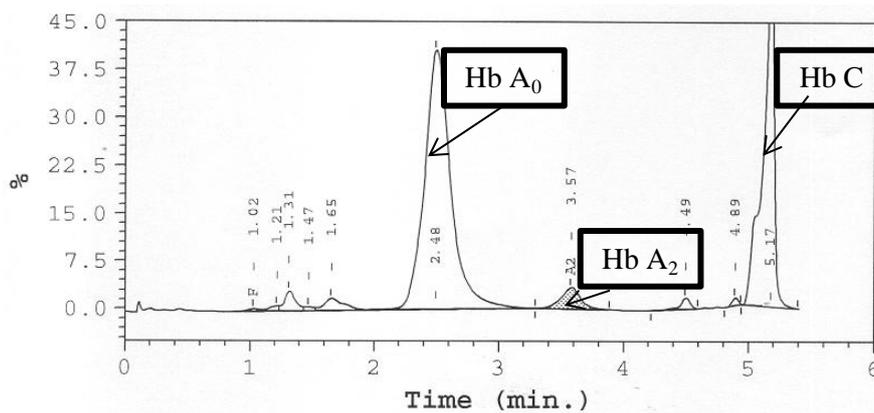


Figura 27 - HPLC de uma amostra de sangue do indivíduo 10. No gráfico é perceptível a visualização de três eluições de Hbs referentes a Hb A<sub>0</sub>, Hb A<sub>2</sub>, e Hb C.

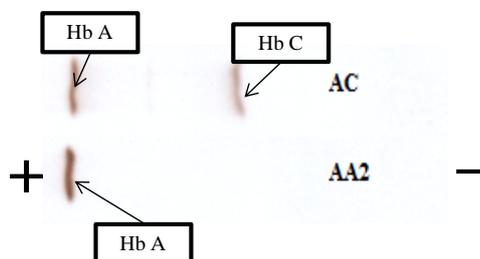


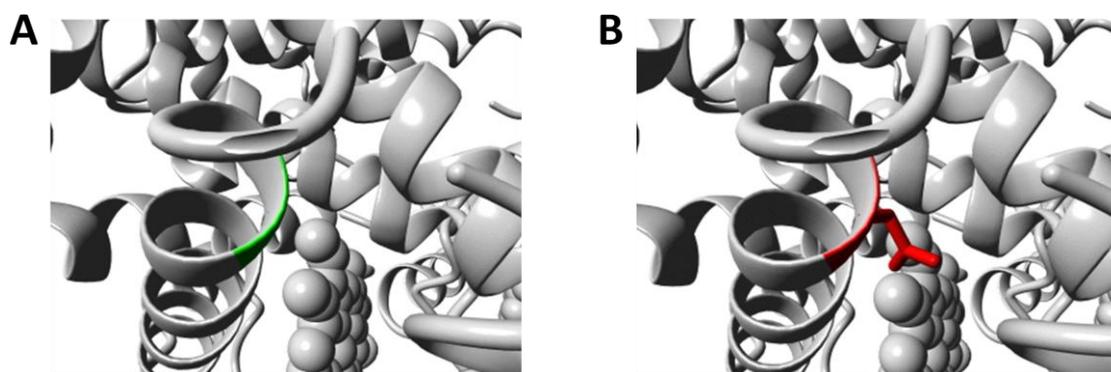
Figura 28 - IEF de um hemolisado do indivíduo 10. A parte superior corresponde à amostra do indivíduo 10 e a parte inferior a uma amostra controlo normal.

Tabela 18 - Parâmetros do estudo das Hbs do indivíduo 10.

Parâmetros	
Hb A <sub>2</sub> (%)	3.4
Hb F (%)	0.3
A0 (%)	56.8
Hb C (%)	33
Perfil HPLC	ACA2
Perfil IEF	AC

Por análise *in silico*, previu-se que esta mutação podia afectar a função da proteína (SIFT score 0,04), e resultar em possíveis danos na molécula (PSIC difference score 0,511). O Project Hope revelou que o resíduo envolvido está localizado na

superfície da proteína, e uma mutação deste resíduo pode perturbar as interações com outras moléculas ou outras partes da proteína. O resíduo original (glutamato) e o resíduo mutante (lisina) diferem em tamanho e carga (Figura 29). O resíduo mutante é maior do que o resíduo original. Este último é carregado negativamente, e o resíduo mutante é carregada positivamente. Esta característica do resíduo mutante pode condicionar contactos com outras moléculas. As diferenças entre os resíduos original e mutante podem levar a perturbações na superfície de interacção e assim afectar a ligação do anel tetrapirrólico.



**Figura 29 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.19G> A; pGlu7Lys (Hb C). (A) Resíduo original (Glutamato); (B) Resíduo mutante (Lisina).**

### **10. Indivíduo 11**

Os parâmetros hematológicos do indivíduo 11 foram obtidos e revelaram níveis VGM diminuídos. A análise das Hbs pelo HPLC revelou níveis de Hb A2 e Hb F normais, e um pico com tempo de retenção referente à Hb D-Punjab (Figura 30). A análise da composição de Hbs e mobilidade electroforética foi realizada por IEF, que revelou duas bandas, uma com mobilidade electroforética correspondente à Hb A e outra à Hb D-Punjab (Figura 31). De modo a confirmar a presença de Hb D-Punjab evidenciada pelos resultados de HPLC e IEF realizou-se a sequenciação de DNA dos genes globínicos  $\beta$ , que revelou uma transição G→C levando a uma substituição de

aminoácido Glu→Gln no codão 121 da cadeia globínica  $\beta$  (c.364G>C; pGlu122Gln, de acordo com HGVD). O resultado da sequenciação confirmou as suspeitas da presença de Hb D-Punjab na forma heterozigótica. Os dados estão sumarizados na Tabela 19.

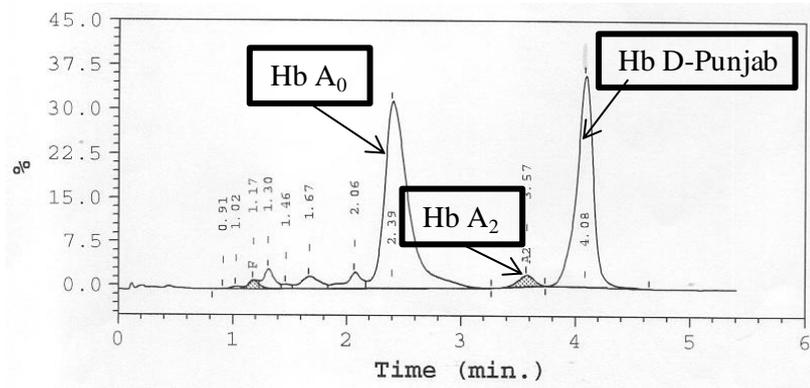


Figura 30 - HPLC de uma amostra de sangue do indivíduo 11. No gráfico é perceptível a visualização de três eluições de Hbs referentes a Hb A<sub>0</sub>, Hb A<sub>2</sub>, e Hb D-Punjab.

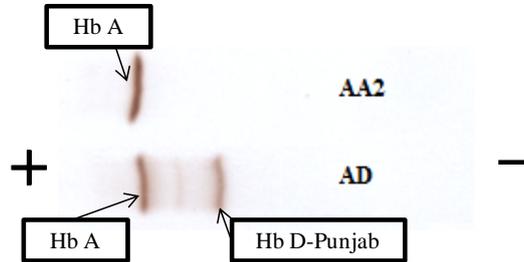
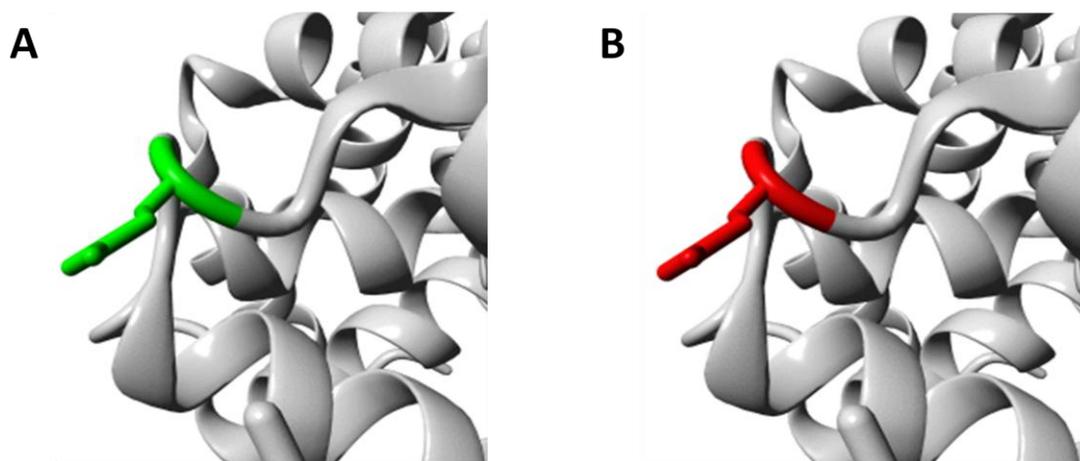


Figura 31 - IEF de um hemolisado do indivíduo 11. A parte inferior corresponde à amostra do indivíduo 11 e a parte superior a uma amostra controlo normal.

**Tabela 19 - Parâmetros hematológicos e moleculares do indivíduo 11.**

Parâmetros	
Género/Idade	Feminino
HGB (g/dL)	16,5
VGM (fL)	47,6
Hb A <sub>2</sub> (%)	2.1
Hb F (%)	0.3
Hb D (%)	38,6
Perfil HPLC	ADA2
Perfil IEF	AD

Pela análise *in silico* previu-se que esta mutação resultava numa mutação benigna para a molécula (PSIC difference score 0.008). O Project Hope revelou que o resíduo de glutamato não é conservado nesta posição, e que outros resíduos têm sido observados nesta. Por isso, esta mutação provavelmente não é prejudicial para a proteína. O resíduo original (glutamato) e o resíduo mutante (glutamina) diferem na carga (Figura 32). O resíduo original é carregado negativamente, enquanto que o resíduo mutante é neutro. A diferença de carga irá perturbar a interacção iónica realizada pelo resíduo original, o que pode causar perda de interacções entre outras moléculas. As diferenças entre os resíduos original e mutante podem levar a distúrbios na superfície de interacção e assim afectar a ligação do anel tetrapirrólico.



**Figura 32 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.364G>C; pGlu122Gln (Hb D-Punjab). (A) Resíduo original (Glutamato); (B) Resíduo mutante (Glutamina).**

### ***11. Indivíduo 12***

Os parâmetros hematológicos do indivíduo 12 foram obtidos, e revelaram ser normais. A análise das Hbs por HPLC revelou níveis de Hb F normais e um pico elevado no tempo de retenção da Hb A<sub>2</sub> (Figura 33). Uma vez que os níveis de Hb A<sub>2</sub> eram muito elevados, mas o hemograma do indivíduo estava normal suspeitou-se que o indivíduo podia ser portador de uma variante de Hb. De modo a confirmar esta suspeita realizou-se a sequenciação de DNA dos genes globínicos  $\beta$ , que revelou uma transição G→A dando origem a uma substituição de aminoácido Glu→Lys no codão 26 da cadeia globínica  $\beta$  (c.79G>A; pGlu27Lys, de acordo com HGVD) (Figura 34). Esta mutação encontrava-se na forma heterozigótica e corresponde à variante Hb E. Os dados estão sumarizados na Tabela 20.

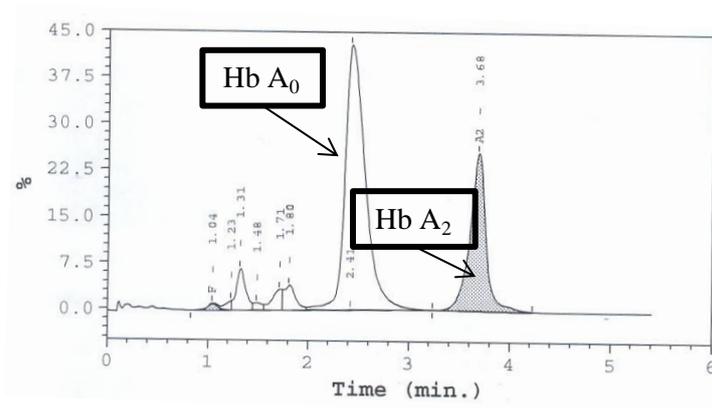


Figura 33 - HPLC de uma amostra de sangue do indivíduo 12. No gráfico é perceptível a visualização de duas eluições de Hbs referentes a Hb A<sub>0</sub> e Hb A<sub>2</sub>.

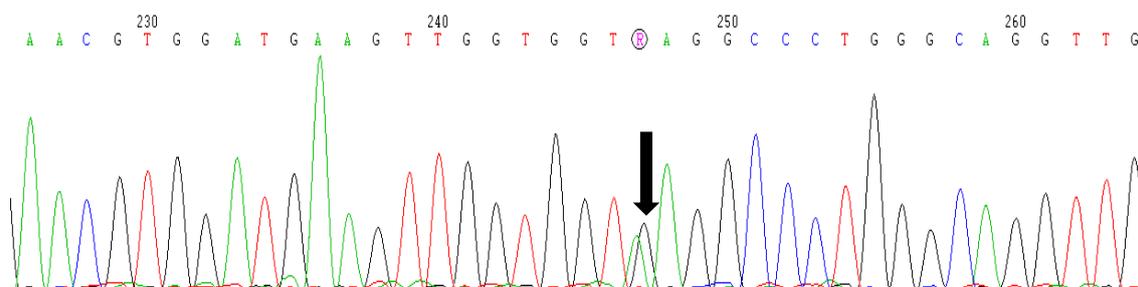


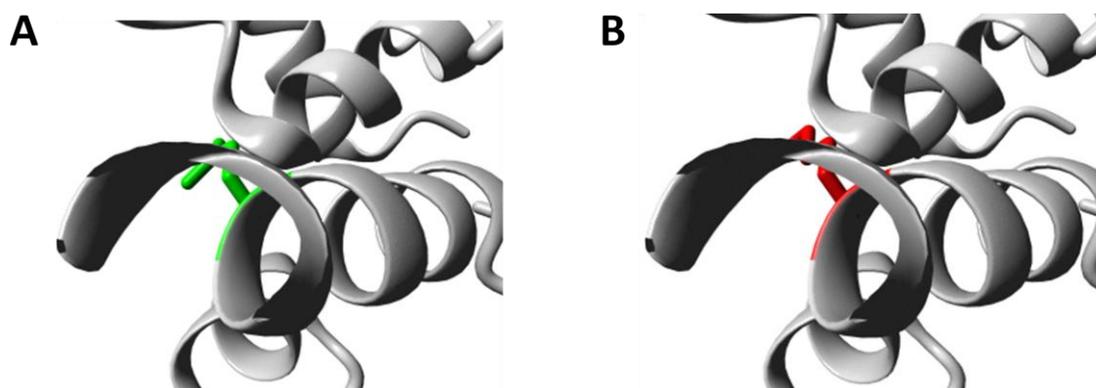
Figura 34 - Sequência de DNA de um fragmento do exão 1 de HBB mostrando a mutação c.79G>A; pGlu27Lys, em heterozigotia.

Tabela 20 - Parâmetros do estudo das Hbs do indivíduo 12.

Parâmetros	
Género/Idade	Feminino
Hb A <sub>2</sub> +X (%)	25.5
Hb F (%)	0.8
Perfil HPLC	AXA2

Por análise *in silico* previu-se que esta mutação afectava a função da proteína (SIFT score 0,02). O Project Hope revelou que o resíduo glutamina nesta posição é muito conservado, no entanto tem-se verificado a presença de outros tipos de resíduos

nesta posição também, tal como o resíduo de lisina. O resíduo de glutamina está localizado à superfície da proteína, e uma mutação neste resíduo pode perturbar as interações com outras moléculas ou outras partes da proteína. O resíduo original (glutamina) e o resíduo mutante (lisina) diferem no tamanho e carga (Figura 35). O resíduo mutante é maior do que o resíduo original. Este último é carregado negativamente, e o resíduo mutante está carregado positivamente. A diferença de carga irá perturbar a interação iónica feita pelo resíduo original, perturbando a superfície de interação e assim afectando a ligação do anel tetrapirrólico.



**Figura 35 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.79G> A; pGlu27Lys (Hb E). (A) Resíduo original (Glutamato); (B) Resíduo mutante (Lisina).**

## **12. Indivíduo 13**

Os parâmetros hematológicos do indivíduo 13 foram obtidos e demonstraram níveis de VGM e HGM abaixo dos valores de referência. A análise das Hbs por HPLC revelou níveis de Hb F e Hb A2 aumentados e dois picos anormais antes do tempo de retenção da Hb A<sub>0</sub> (Figura 36). A análise da composição de Hbs e mobilidade electroforética foi realizada por IEF, que revelou a presença de uma banda com mobilidade electroforética correspondente à Hb Lepore (Figura 37). De modo a verificar

a veracidade deste resultado realizou-se MLPA dos genes globínicos  $\beta$ , que revelou uma deleção entre a posição nucleotídica 87 do gene globínico  $\delta$  até a 116 do gene globínico  $\beta$  dando origem a uma hemoglobina híbrida [( $\delta$  through 87;  $\beta$  from 116) NG\_000007.3:g.63632\_71046del, de acordo com HGVD)]. Esta variante de Hb é a Hb Lepore-Washington-Boston e encontrava-se na forma heterozigótica. Através dos resultados provenientes do PCR em tempo real tratados no REST 2009 foi obtido o rácio mRNA  $\alpha/\beta$  do indivíduo, que foi de 1,8. Os dados estão sumarizados na Tabela 21.

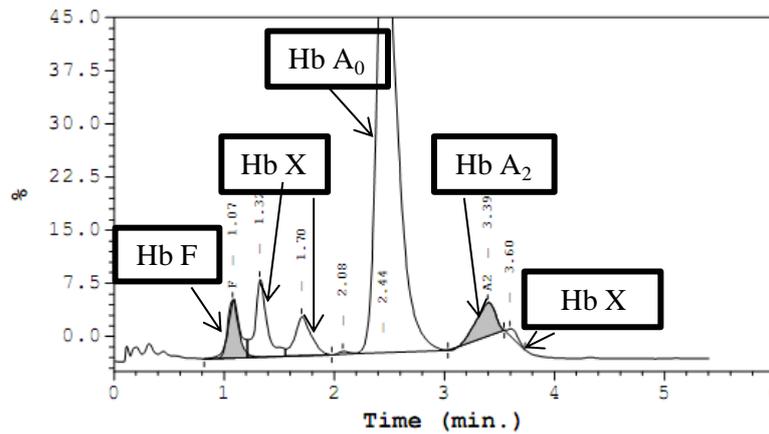


Figura 36 - HPLC de uma amostra de sangue do indivíduo 13. No gráfico é perceptível a visualização de cinco eluições de Hbs referentes a Hb F, Hb X, Hb A<sub>0</sub> e Hb A<sub>2</sub>.

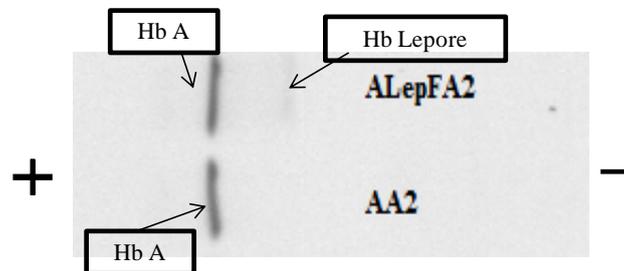


Figura 37 - IEF de um hemolisado do indivíduo 13. A parte superior corresponde à amostra do indivíduo 13 e a parte inferior a uma amostra controlo normal.

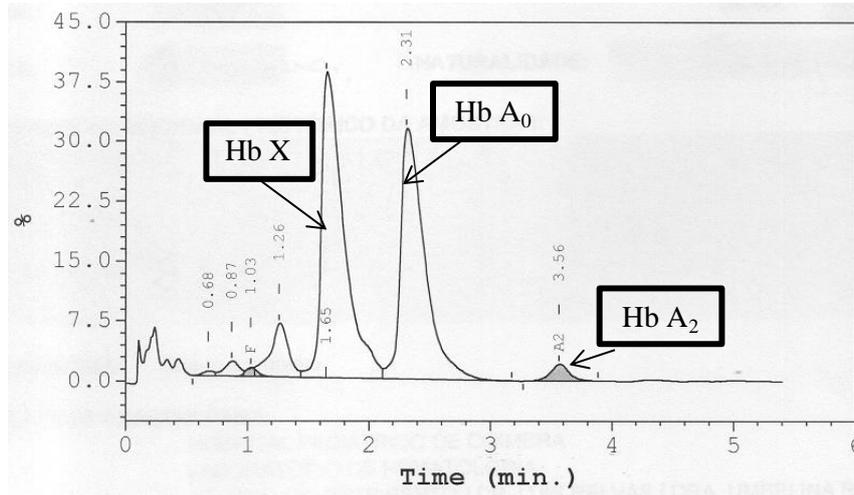
**Tabela 21 - Parâmetros hematológicos e moleculares do indivíduo 13.**

Parâmetros	
Gênero/Idade	Masculino/47
Rácio mRNA $\alpha/\beta$	1.8
HGB (g/dL)	15,8
VGM (fL)	72,6
HGM (pg)	24,8
Reticulócitos	1,16
Hb A <sub>2</sub> (%)	4
Hb F (%)	4.5
A0 (%)	77.8
P2 (%)	4.1
P3 (%)	4.5
Perfil HPLC	AlepFA2

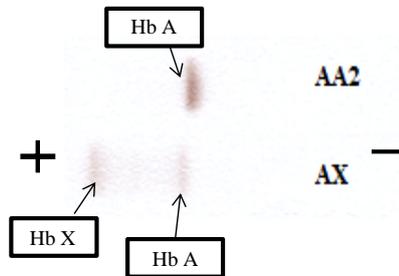
### **13. Indivíduo 14**

Os parâmetros hematológicos do indivíduo 14 foram obtidos e encontravam-se dentro dos valores de referência. A análise das Hbs por HPLC revelou níveis de Hb A<sub>2</sub> e Hb F dentro dos valores normais, e um pico anormal antes do tempo de retenção correspondente à Hb A<sub>0</sub> (Figura 38). A análise da composição de Hbs e mobilidade electroforética foi realizada por IEF, que revelou uma banda com mobilidade electroforética diferente da Hb A (Figura 39). Estes resultados pressupunham a presença de uma variante de Hb, por isso foi realizada a sequenciação de DNA dos genes globínicos  $\beta$ , que revelou uma transição A→G dando origem a uma substituição de aminoácido Lys→Glu no codão 95 da cadeia globínica  $\beta$  (c.286A>G; pLys96Glu, de

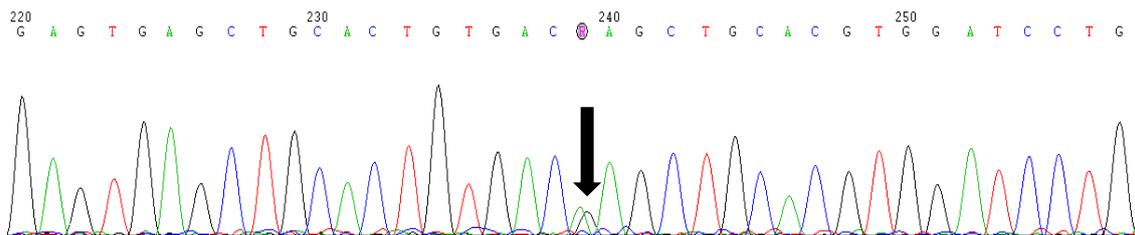
acordo com HGVD) (Figura 40). Desta forma confirmou-se a presença de uma variante de Hb, a Hb N-Baltimore, na forma heterozigótica. Os dados estão sumarizados na Tabela 22.



**Figura 38 - HPLC de uma amostra de sangue do indivíduo 14. No gráfico é perceptível a visualização de três eluições de Hbs referentes a Hb X, Hb A<sub>0</sub> e Hb A<sub>2</sub>.**



**Figura 39 - IEF de um hemolisado do indivíduo 14. A parte de superior é referente a uma amostra controlo e a parte inferior corresponde à amostra do indivíduo 14, onde é possível visualizar duas bandas. Estas bandas correspondiam à Hb A e a uma variante de Hb.**

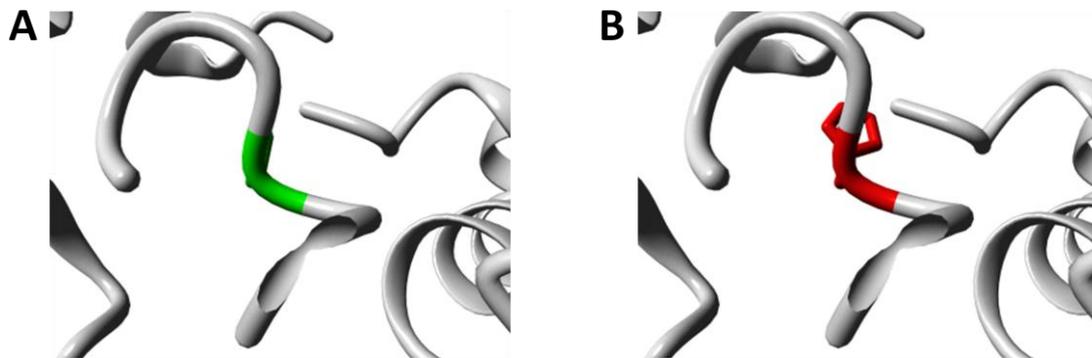


**Figura 40 - Sequência de DNA de um fragmento do exão 2 de HBB mostrando a mutação c.286A>G; pLys96Glu, de acordo com HGVD, em heterozigotia.**

**Tabela 22 - Parâmetros do estudo das Hbs do indivíduo 14.**

Parâmetros	
Hb A <sub>2</sub> (%)	2
Hb F (%)	0.8
A0 (%)	41.4
P2 (%)	6.7
P3 (%)	47.3
Perfil HPLC	AXA2
Perfil IEF	AX

Por análise *in silico* previu-se que esta mutação podia ser tolerada relativamente à função da proteína (SIFT score 0,07), e resultar num fenótipo benigno para a molécula (PSIC difference score 0,180). Pelo Project Hope verificou-se que a posição do resíduo de lisina é muito conservada, embora outros resíduos tenham sido observados nessa posição. O resíduo original (lisina) e o resíduo mutante (glutamato) diferem na carga e no tamanho (Figura 41). O resíduo mutante é menor do que o resíduo original, o que poderá levar à perda de interacções externas. O resíduo original está carregado positivamente, e o mutante negativamente, o que pode condicionar contactos com outras moléculas. Estas diferenças entre os resíduos original e mutante levarão possivelmente a perturbações na superfície de interacção e assim afectar a ligação do anel tetrapirrólico.

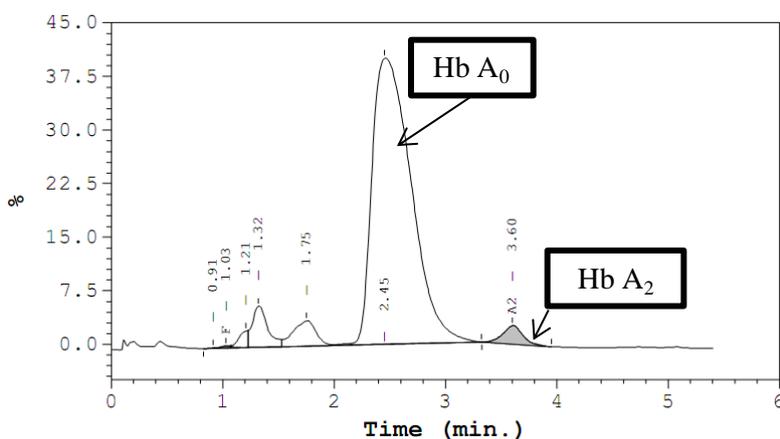


**Figura 41 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.286A> G; pLys96Glu (Hb N-Baltimore). (A) Resíduo original (Lisina); (B) Resíduo mutante (Glutamato).**

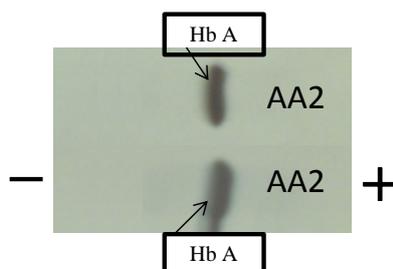
#### **14. Indivíduo 15**

A análise das Hbs por HPLC do indivíduo 15 revelou níveis de Hb A<sub>2</sub>, Hb F e Hb A<sub>0</sub> normais, no entanto o pico desta última apresentava-se ligeiramente mais largo que o normal (Figura 42). A fim de avaliar a composição de Hbs e mobilidade electroforética relativa, o hemolisado do portador da variante foi analisado por IEF e por electroforese em acetato de celulose. Com a técnica de IEF não foi possível destacar a presença de uma variante de hemoglobina. De facto, como mostrado na Figura 43, o hemolisado tem uma única componente com mobilidade electroforética igual à da Hb A. A electroforese em acetato de celulose revelou a presença de uma banda anormal referente a uma variante de Hb (Figura 44). Uma vez que estes resultados pressupunham a presença de uma variante de Hb, realizaram-se duas técnicas que evidenciavam as cadeias globínicas, HPLC em fase reversa e AUT-PAGE. No HPLC de fase reversa verificou-se a presença de três picos relativos às cadeias globínicas, um pico relativo à cadeia  $\beta$  mutada e outro à cadeia  $\beta$  normal e um pico relativo à cadeia  $\alpha$  (Figura 45). A electroforese em condições desnaturantes (AUT-PAGE) revelou duas bandas, correspondentes às cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  (Figura 46). De modo a confirmar a presença de uma

variante de Hb realizou-se a sequenciação de DNA dos genes globínicos  $\beta$  foi realizada e revelou uma transição C→T dando origem a uma substituição de aminoácido Pro→Leu no codão 5 da cadeia globínica  $\beta$  (c.17C> T; pPro6Leu, de acordo com HGVD). Esta mutação corresponde à variante Hb Aix-les-Bains e encontrava-se na forma heterozigótica. A afinidade para o oxigénio da variante de Hb foi determinada em Tris/HCl 0.1 M NaCl 0.1 M ao valor de pH 7.4, quer na ausência quer na presença de 2,3-DPG, a 37°C. Na ausência e na presença de 2,3-DPG não existiam diferenças apreciáveis entre as propriedades funcionais dos dois sistemas, e por isso as propriedades de ligação do hemolisado ao O<sub>2</sub> eram idênticas às propriedades do hemolisado normal (Figura 47). Os dados estão sumarizados na Tabela 23.



**Figura 42 - HPLC de uma amostra de sangue indivíduo 15. No gráfico é perceptível a visualização de duas eluições de Hbs referentes a Hb A<sub>0</sub> e Hb A<sub>2</sub>.**



**Figura 43 - IEF de um hemolisado do indivíduo 15. A parte inferior corresponde à amostra do indivíduo 15 e a parte superior a uma amostra controlo normal.**

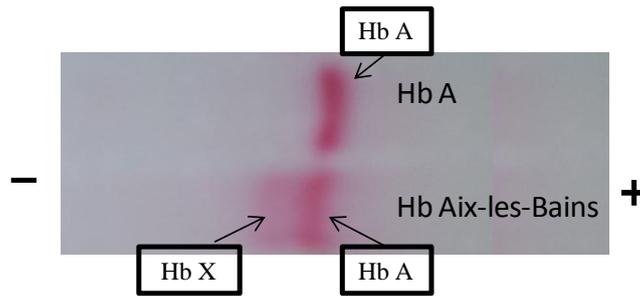


Figura 44 - Electroforese de acetato de celulose de uma amostra de sangue do indivíduo 15. A parte inferior corresponde à amostra do indivíduo 15 e a parte superior a uma amostra controlo normal.

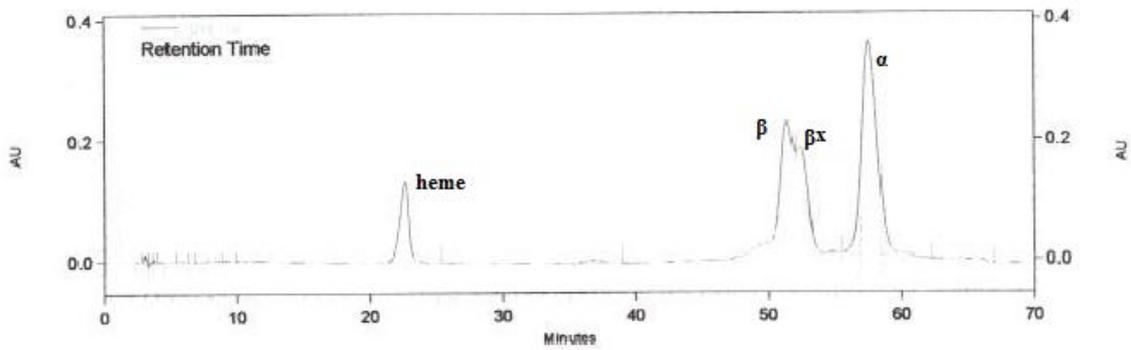


Figura 45 – HPLC de fase reversa das globinas de uma amostra de sangue do indivíduo 15.

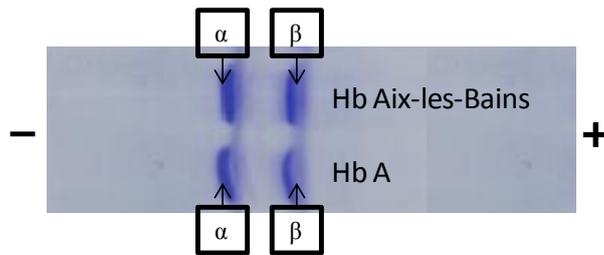
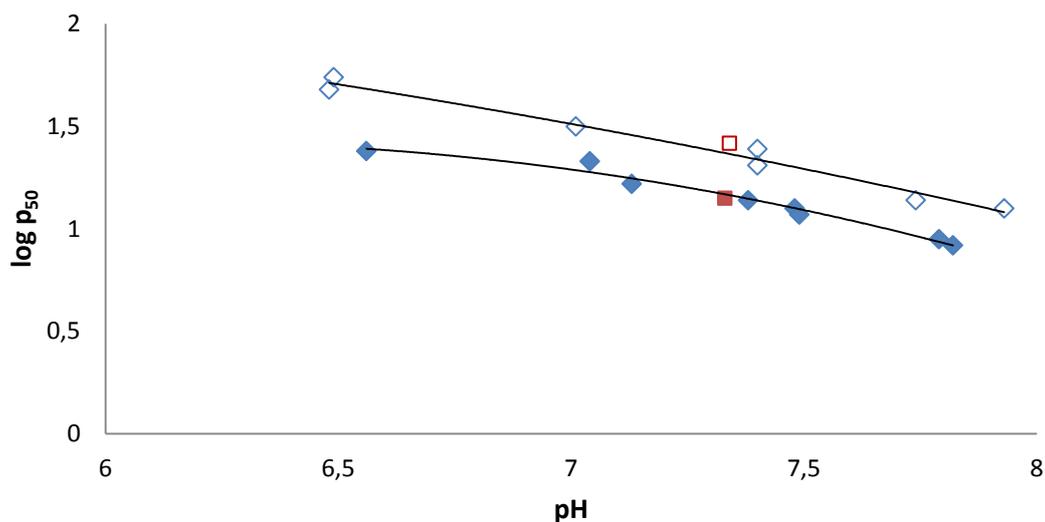


Figura 46 - AUT-PAGE das cadeias globínicas do hemolisado do indivíduo 15. A parte superior corresponde ao hemolisado do indivíduo 15 e a parte inferior a uma amostra controlo normal.



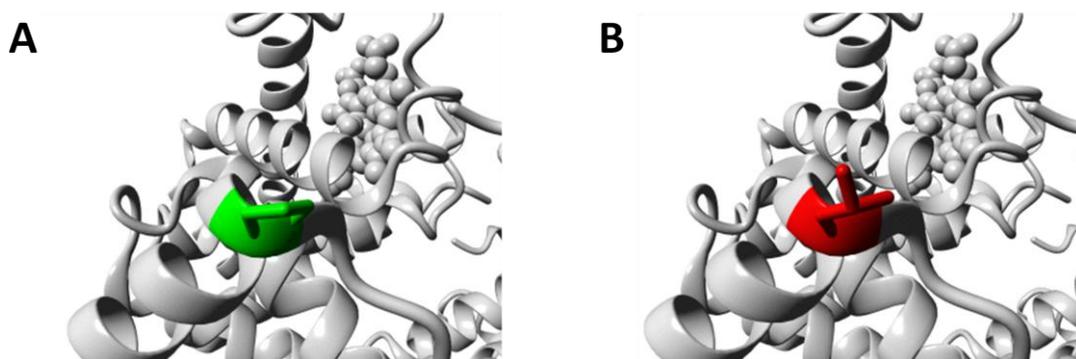
**Figura 47 - Afinidade para o oxigênio (logp<sub>50</sub>) de um hemolisado normal (losango azuis) e variante Hb Aix-les-Bains (quadrado vermelho). Condições experimentais: tampão 0.1 M Bis-Tris ou Tris/HCl + 0.1 M NaCl, na ausência (símbolos preenchidos) e na presença de 2,3-DPG, a 37°C.**

**Tabela 23 - Parâmetros do estudo das Hbs do indivíduo com Hb Aix-les-Bains.**

Parâmetros	
Gênero/Idade	Masculino
Hb A <sub>2</sub> (%)	2.6
Hb F (%)	0.2
Perfil HPLC	AA2
Perfil IEF	AA2

Por análise *in silico*, previu-se que a mutação resulta num fenótipo provavelmente prejudicial para a molécula (PSIC difference score 1,000). O Project Hope demonstrou que o resíduo original (prolina) está localizado na superfície da proteína, e que uma mutação deste resíduo pode perturbar as interações com outras moléculas ou outras partes da proteína. O resíduo original difere em tamanho do resíduo mutante (leucina), sendo que este último é maior (Figura 48). As diferenças entre os

resíduos original e mutante podem levar à perturbação da superfície de interacção e, assim, afectar a ligação do anel tetrapirrólico.



**Figura 48 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação c.17C> T; pPro5Leu (Hb Hb Aix-les-Bains). (A) Resíduo original (Prolina); (B) Resíduo mutante (Leucina).**

### **15. Indivíduos 16 e 17**

Os parâmetros hematológicos do indivíduo 16 foram obtidos e demonstraram níveis de HGB ligeiramente abaixo do normal, e de reticulócitos acima do normal. Análise das Hbs por HPLC revelou níveis de Hb A<sub>2</sub> e Hb F e um pico anormal logo depois do pico com tempo de retenção correspondente à Hb A<sub>0</sub> (Figura 49). A análise da composição de Hbs e mobilidade electroforética foi realizada por IEF, que revelou uma banda anormal correspondente a uma variante de Hb (Figura 50). Estes resultados evidenciam a presença de uma variante de Hb. De modo a confirmar esta suspeita realizou-se a sequenciação de DNA dos genes globínicos  $\beta$ , que revelou uma transição GC→TT dando origem a uma substituição de aminoácido Ala→Phe no codão 142 da cadeia globínica  $\beta$  [(c.427G> C; c.428C>T) pAla143Phe, de acordo com HGVD). A mutação do indivíduo estava na forma heterozigótica. Os dados estão sumarizados na Tabela 24.

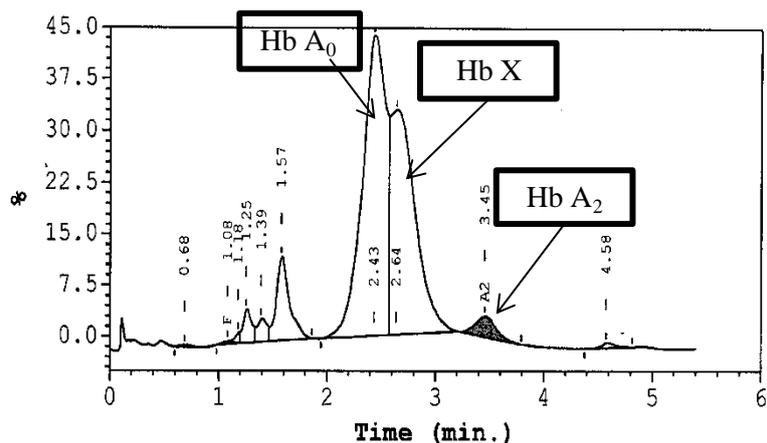


Figura 49 - HPLC das Hbs de uma amostra de sangue do indivíduo 16. No gráfico é perceptível a visualização de três eluições de Hbs referentes a Hb X, Hb A<sub>0</sub> e Hb A<sub>2</sub>.

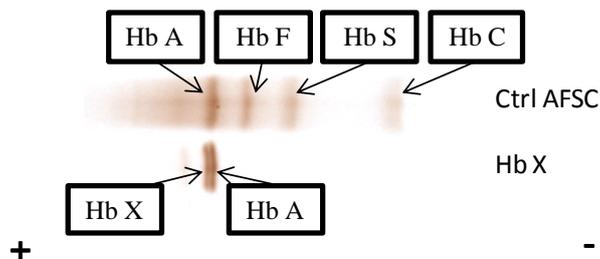


Figura 50 - IEF das Hbs de um hemolisado do indivíduo 16. A parte inferior corresponde à amostra do indivíduo 16 e a parte superior a uma amostra controlo múltiplo.

Para além deste indivíduo, esta mutação foi ainda detectada noutra indivíduo correlacionado (17). A análise das Hbs por HPLC revelou níveis de Hb A<sub>2</sub> normais, de Hb F elevados e um pico anormal logo depois do pico com tempo de retenção correspondente à Hb A<sub>0</sub> (Figura 51). A análise da composição de Hbs e mobilidade electroforética foi realizada por IEF, que revelou uma banda anormal correspondente à uma variante de Hb (Figura 52). Através destes resultados criou-se a suspeita da presença de uma variante de Hb. De modo a confirmar esta suspeita realizou-se a sequenciação de DNA dos genes globínicos  $\beta$ , que revelou uma transição GC→TT dando origem a uma substituição de aminoácido Ala→Phe no codão 142 da cadeia

globínica  $\beta$  [(c.427G> C; c.428C>T) pAla143Phe, de acordo com HGVD]. A mutação do indivíduo estava na forma heterozigótica. Os dados estão sumarizados na Tabela 24.

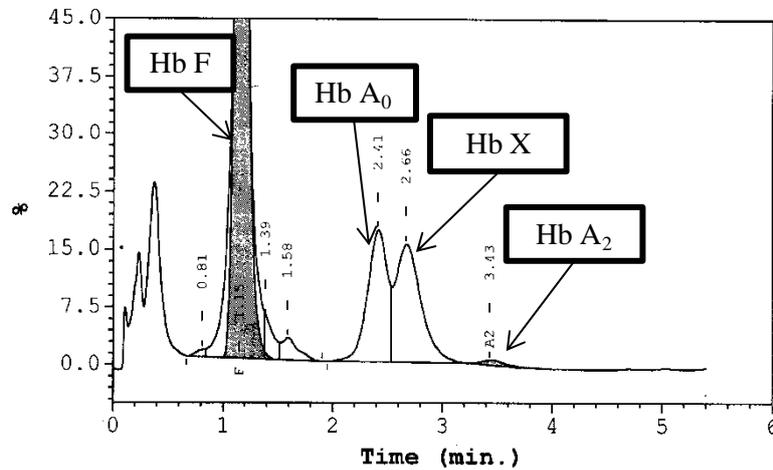


Figura 51 - HPLC das Hbs de uma amostra de sangue do indivíduo 17. No gráfico é perceptível a visualização de quatro eluições de Hbs referentes a Hb F, Hb X, Hb A<sub>0</sub> e Hb A<sub>2</sub>.

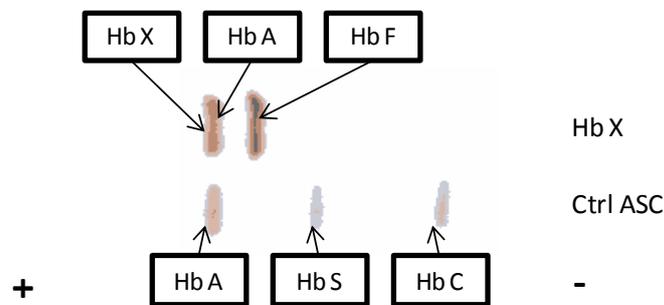


Figura 52 - IEF das Hbs de um hemolisado do indivíduo 17. A parte superior corresponde à amostra do indivíduo 17 e a parte inferior a uma amostra controlo múltiplo.

**Tabela 24 - Parâmetros hematológicos e moleculares dos indivíduos com 16 e 17.**

Parâmetros	16	17
Género/Idade	Feminino/19	Feminino/1 dia
HGB (g/dL)	11,1	
VGM (fL)	105,9	
HGM (pg)	28,3	
Reticulócitos	2,49	
Hb A <sub>2</sub> (%)	3	0.6
Hb F (%)	0.2	65.1
X (%)	37.9	13.4
Perfil HPLC	AXA2	FAX
Perfil IEF	AXA2	FAX

Por análise *in silico*, prevê-se que esta mutação podia afectar a função da proteína (SIFT score 0,00), e resultar em danos prováveis na molécula (PSIC difference score 0,999). Pelo Project Hope verificou-se que o resíduo de alanina se localiza no interior da proteína num domínio importante para a ligação de outras moléculas, mas não está em contacto directo com o ligante. No entanto, a mutação pode prejudicar a estabilidade local, que por sua vez pode afectar os contactos a ligandos realizados por outros resíduos vizinhos. A alanina nesta posição não é conservada, no entanto o resíduo de fenilalanina não tem sido observado nesta posição em outras sequências homólogas e por isso é possível que a mutação seja prejudicial para a proteína. O resíduo original (alanina) e o resíduo mutante (fenilalanina) diferem no tamanho, sendo que este último é maior (Figura 53). Desta forma, o resíduo mutante pode não ser demasiado grande para encaixar na posição referida. As diferenças entre os resíduos

original e mutante podem levar a distúrbios no interior da estrutura e assim afectar as propriedades de ligação.

Através das *MD simulations* para o estudo do efeito da mutação na estrutura e função da Hb, identificou-se o local onde está situada a mutação CD142 Ala>Phe, e os resíduos que podem ficar afectados por esta (Figura 54). Estes resíduos são a Tyr  $\beta$ 145, Val  $\beta$ 98, e histidina proximal. Verificou-se também que a mutação pode levar a alguma perturbação na estrutura da Hb, como relevado pela distribuição dos ângulos de torção (Figura 54 e Figura 55).

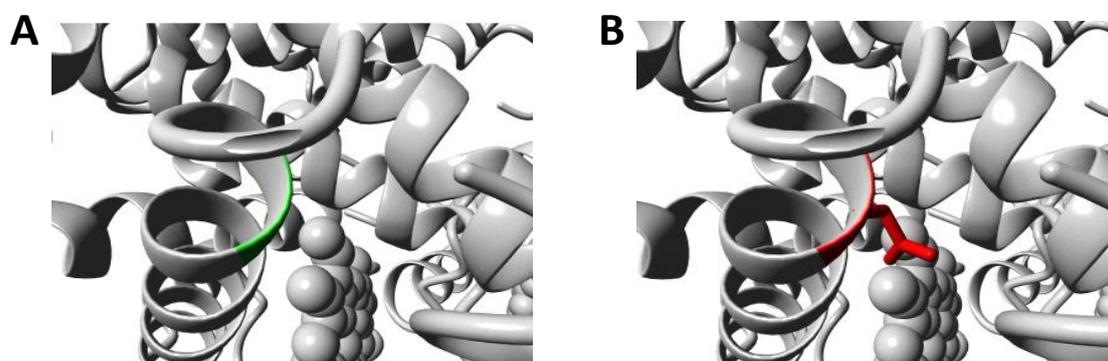


Figura 53 - Localização da mudança estrutural causada pela mutação [(c.427G> C; c.428C>T) pAla143Phe. (A) Resíduo original (Alanina); (B) Resíduo mutante (Fenilalanina).

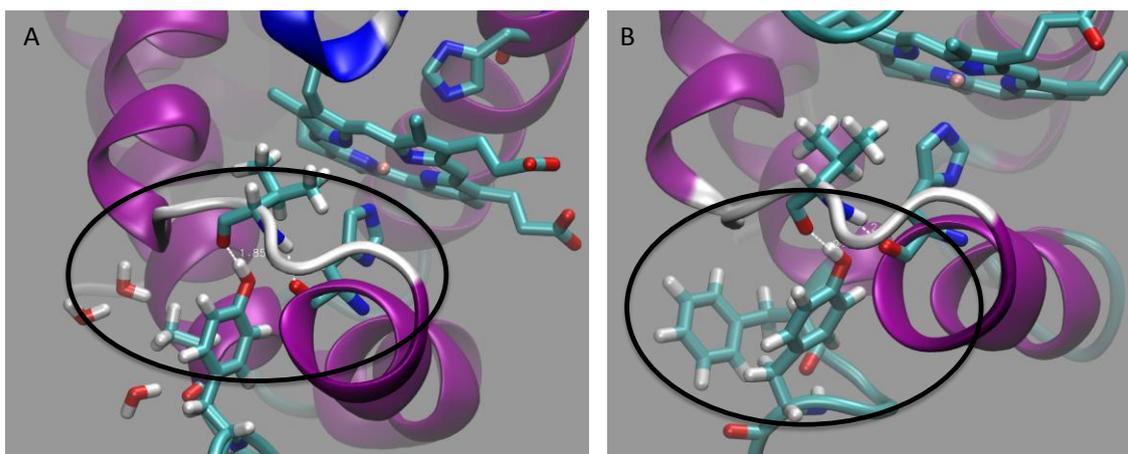
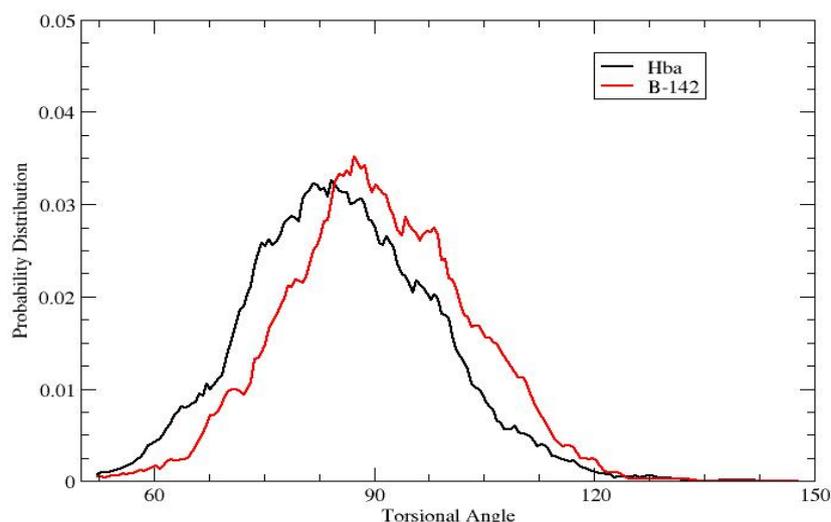


Figura 54 - Captação da região de interesse da mutação depois de 100 nanosegundos. A - O resíduo Ala  $\beta$ 142 está perto da Tyr  $\beta$ 145 que tem um hidrogénio ligado a Val  $\beta$ 98, um hidrogénio deste último resíduo está à histidina proximal. B - O resíduo Phe  $\beta$ 142 não perturbam em 100 nanosegundos a ligação de hidrogénio envolvendo Tyr  $\beta$ 145, Val 98 e a histidina proximal.



**Figura 55 - Distribuição de probabilidade do ângulo de torção CA-CB-CG-ND da histidina proximal da subunidade  $\beta$  obtido durante simulações de 100 nanosegundos. O valor é ligeiramente perturbado pela mutação CD142 Ala $\rightarrow$ Phe. A linha colorida a preto corresponde à Hb A e a linha colorida a vermelho corresponde à Hb com a mutação CD142 Ala $\rightarrow$ Phe.**

## **16. Indivíduo 18**

Os parâmetros hematológicos do indivíduo 18 foram obtidos e apresentavam níveis de HGB e HGM ligeiramente diminuídos, e de reticulócitos ligeiramente aumentados. A análise das Hbs por HPLC revelou níveis de Hb A2 e Hb F e um pico anormal elevado antes do tempo de retenção da Hb A<sub>0</sub> (Figura 56). De modo a avaliar a composição de Hbs e mobilidade electroforética relativa, submeteu-se o hemolisado do propósito a IEF comparando-o com um controlo Hb A. De facto verifica-se a presença de uma variante, pela banda anormal observada (Figura 57 **Error! Reference source not found.**). Na análise das Hbs por electroforese em acetato de celulose detectou-se uma banda com mobilidade electroforética distinta da Hb A, referente à uma variante de Hb (Figura 58). De forma a verificar-se a existência de tetrâmeros normais e anormais realizou-se SDS-PAGE, que não revelou a existência de tetrâmeros anormais (Figura 59). A fim de avaliar as cadeias globínicas da amostra do indivíduo 18 realizaram-se as técnicas de HPLC de fase reversa e AUT-PAGE. No HPLC de fase reversa verificou-se

a presença de um pico relativo à cadeia  $\beta$  normal e um pico relativo à cadeia  $\alpha$  (Figura 60), e o rácio entre as cadeias  $\alpha/\beta$  foi de 1,51. Na electroforese em condições desnaturantes (AUT-PAGE), o hemolisado do propósito foi comparado com o hemolisado de Hb A, e verificou-se que no hemolisado de Hb A apareciam duas bandas correspondentes às cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , e no hemolisado do propósito aparecia uma banda adicional mais anódica que o normal (Figura 61). De modo a comprovar as suspeitas levantadas pelos resultados anteriores realizou-se a sequenciação de DNA dos genes globínicos  $\beta$ , que revelou uma inserção de 11 codões, entre o codão 47 e 48 da cadeia globínica  $\beta$ , e possivelmente uma deleção de 33 bp dos nucleótidos 521 ao 553, da sequência de intervenção 2, e a presença de uma sequência não reconhecível entre os nucleótidos 555 e 576, da sequência de intervenção 2 (Figura 62). A mutação do indivíduo estava na forma heterozigótica. Foram realizados ainda testes funcionais, teste de estabilidade e teste de afinidade para o oxigénio. O teste de estabilidade com isopropanol foi nitidamente positivo, pois o hemolisado precipita após 30 minutos de incubação a 37°C. Os parâmetros de ligação do oxigénio com a variante de hemoglobina do hemolisado foram obtidos em função do pH, a 37°C, na presença ou na ausência de 2,3-DPG e comparado com um controlo Hb A (Figura 63 e Figura 64). Na ausência e na presença de 2,3-DPG não existem diferenças apreciáveis entre as propriedades funcionais dos dois sistemas. A cooperatividade da ligação do oxigénio com a Hb do hemolisado (26% de variante de Hb) é indicada pelo valor do coeficiente de Hill  $n_{50}$ , que é muito semelhante ao do controlo Hb A, na ausência de 2,3-DPG. Na presença deste co-factor fisiológico, o  $n_{50}$  é ligeiramente inferior ( $n_{50}=2.1$ ) em relação ao hemolisado normal ( $n_{50}=2,6$ ). Os dados estão sumarizados na Tabela 25.

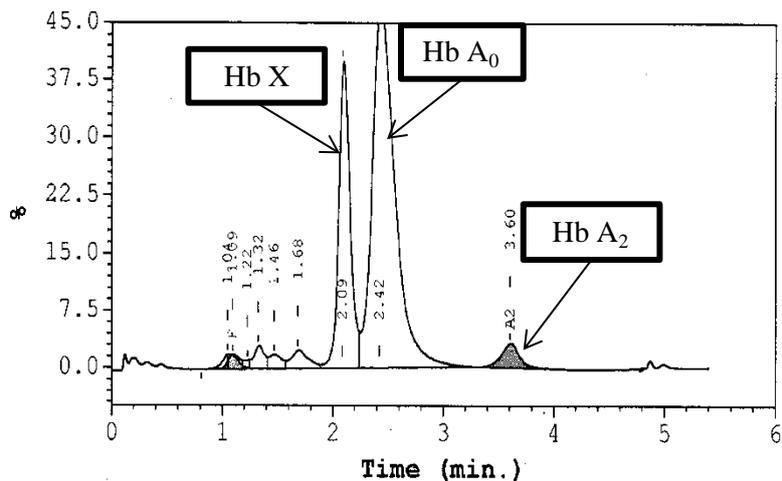


Figura 56 - HPLC das Hbs de uma amostra de sangue do indivíduo 18. No gráfico é perceptível a visualização de três eluições de Hbs referentes a Hb X, Hb A<sub>0</sub> e Hb A<sub>2</sub>.

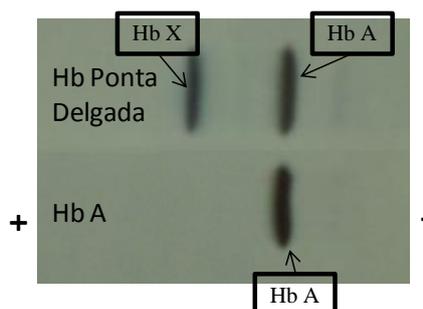


Figura 57 - IEF das Hbs de um hemolisado do indivíduo 18. A parte superior corresponde à amostra do propósito e a inferior a um controlo normal. Na amostra do propósito é possível visualizar duas bandas, uma referente à Hb A e outra a uma variante de Hb.

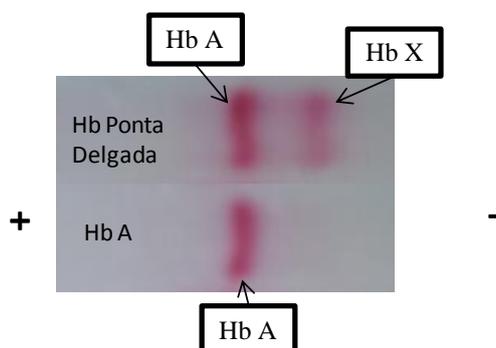


Figura 58 - Electroforese em acetato de celulose de uma amostra de sangue do indivíduo 18. A parte superior corresponde à amostra do indivíduo 18 e a parte inferior a uma amostra controlo normal.

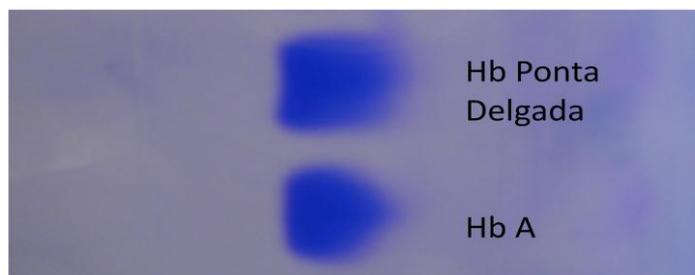


Figura 59 – SDS do tetrâmero de um hemolisado do indivíduo 18. A parte superior corresponde à amostra do indivíduo 18 e a parte inferior a uma amostra controlo normal.

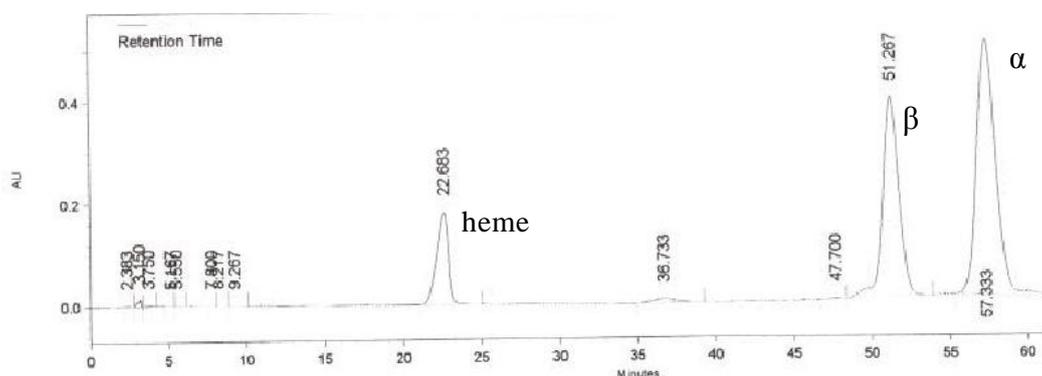


Figura 60 - HPLC de fase reversa de uma amostra de sangue do indivíduo 18. É possível verificar a eluição do heme, cadeia globínica  $\alpha$  e  $\beta$  normais.

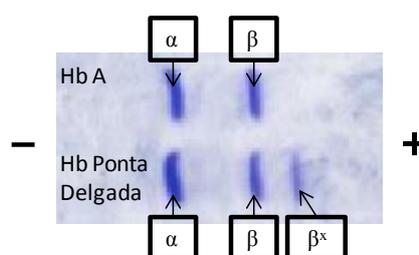


Figura 61 - AUT-PAGE das cadeias globínicas do hemolisado do indivíduo 18. A parte inferior corresponde à amostra do indivíduo 18 e a parte superior a uma amostra controlo normal. É possível visualizar no poço referente à amostra do indivíduo, a migração de três cadeias globínicas: uma  $\alpha$  e  $\beta$  normais e uma  $\beta$  anormal.

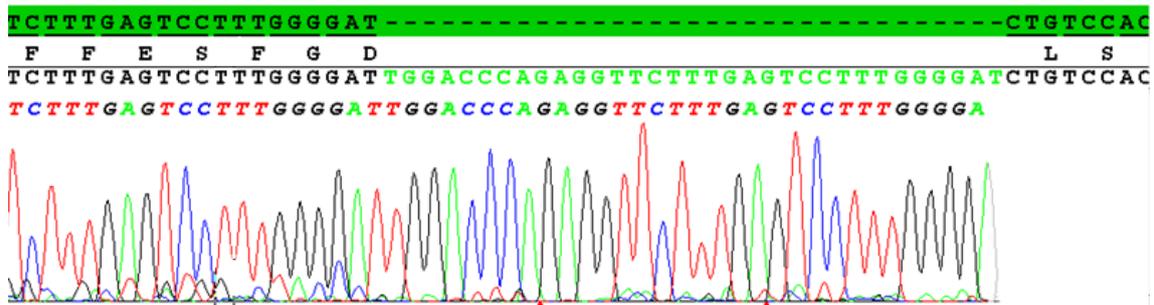


Figura 62 - Sequência de DNA de uma parte do exão 2 mostrando a inserção de 33 pb.

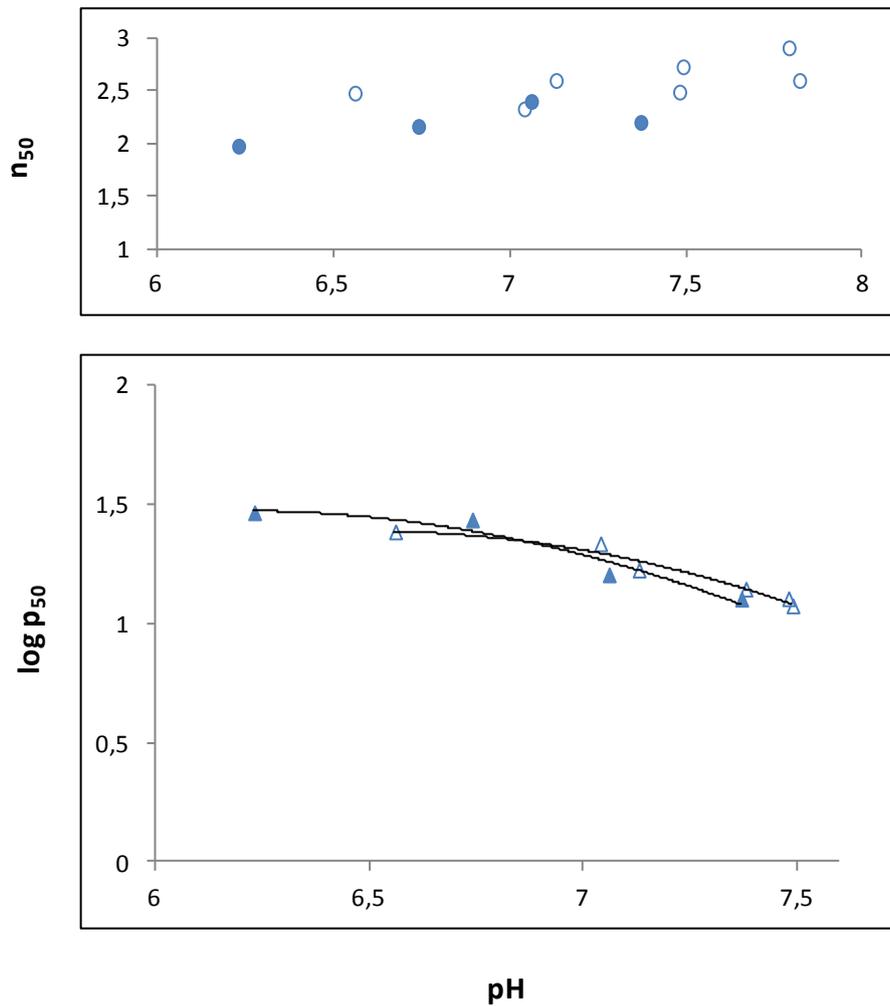


Figura 63 - Efeito do pH na afinidade do oxigênio ( $\log p_{50}$ ) e cooperatividade ( $n_{50}$ ) de hemolisados normais (símbolos abertos) e da variante Hb Ponta Delgada (símbolos fechados). Condições experimentais: tampão 100 mM Bis-Tris ou Tris/HCl + 100 mM NaCl, na ausência de 2,3 DPG, a 37°C.

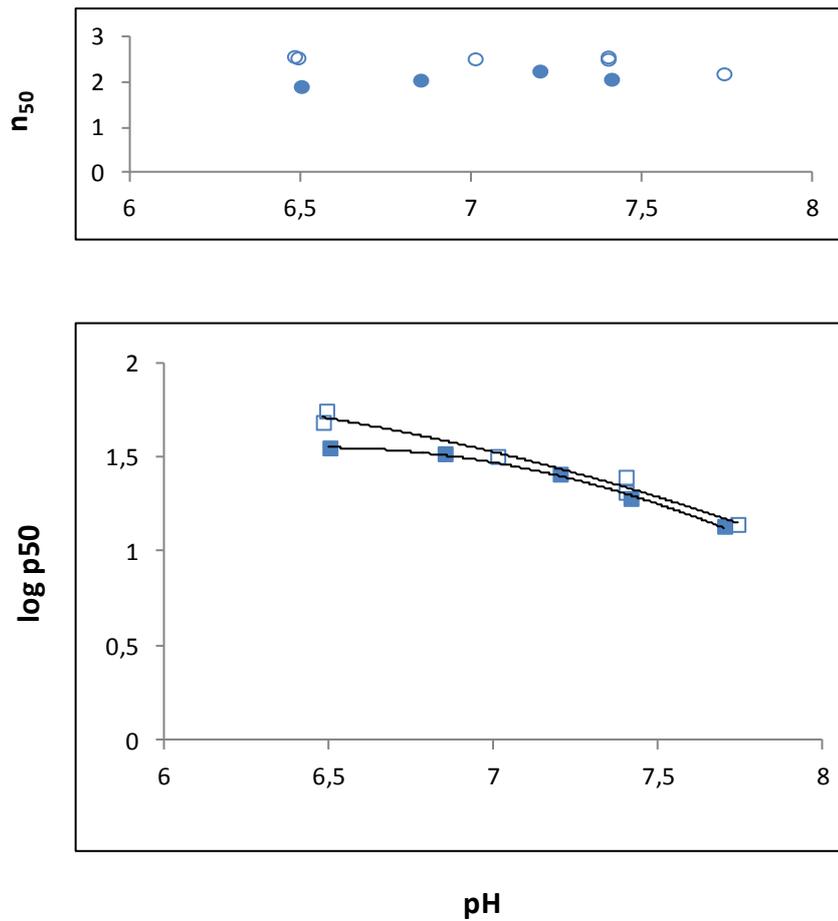


Figura 64 – Efeito do pH na afinidade ao oxigénio ( $\log p_{50}$ ) e cooperatividade ( $n_{50}$ ) de hemolisados normais (símbolos abertos) e da variante Hb ponta Delgada (símbolos fechados). Condições experimentais: tampão 100 mM Bis-Tris ou Tris/HCl + 100 mM NaCl, na presença de 2,3-DPG, a 37°C.

**Tabela 25 - Parâmetros hematológicos e moleculares do indivíduo 18.**

Parâmetros	
Gênero/Idade	Feminino/34
Rácio cadeias $\alpha/\beta$	1,51
HGB (g/dL)	11,1
VGM (fL)	89,9
HGM (pg)	24,9
Reticulócitos	2,8
Hb A <sub>2</sub> (%)	3.2
Hb F (%)	1.3
X (%)	26.4
Perfil HPLC	AXA2
Perfil IEF	AXA2

## **DISCUSSÃO**

## 1. Variantes descritas

### 1.1. Indivíduo 1 - Hb Köln

Através da sequenciação dos genes globínicos  $\beta$  foi possível identificar a Hb Köln (c.295G>A; pVal99Met, de acordo com HGVD) na forma heterozigótica no indivíduo 1.

O resíduo de valina no codão 98 (FG5) da cadeia globínica  $\beta$  está localizado internamente e envolvido no contacto heme. No estado desoxi da hemoglobina este resíduo localiza-se na interface  $\alpha 1\beta 2$ . O resíduo de valina tem como cadeia lateral um grupo hidrocarbonado alifático grande, que confere a este resíduo carga neutra a pH 7.4 e propriedades apolares. Por outro lado o resíduo de metionina tem como cadeia lateral um grupo hidrocarbonado largo com um grupo tioéter, que confere a este resíduo carga neutra a pH 7.4 e propriedades apolares (Berg et al., n.d.) (Campbell & Farrell, 2006). Os resíduos de valina e metionina têm em comum a carga e a polaridade, no entanto o resíduo de metionina tem na sua cadeia lateral um átomo de enxofre. Este átomo de enxofre no interior do tetrâmero vai destabilizar o contacto  $\alpha 1\beta 1$ . Desta forma, a substituição da valina por metionina na hélice FG5 altera a configuração estérica da cadeia globínica  $\beta$ , e, ou altera a reacção de redução do ferro ou resulta num aumento da conversão de metemoglobina em Hb desnaturada. Quando a Hb Köln está na conformação oxigenado, a molécula é saturada com grupos heme, e é estável. A transição para o estado desoxigenado resulta na perda de grupos heme, instabilidade, precipitação e formação de corpos de Heinz, e no aumento da afinidade para o oxigénio. (Miranda, Fonseca, & Figueiredo, 1997)(Galacteros et al., 1989) (Horst, Oehme, & Kohne, 1986) (Marengo-Rowe, 2006) (Sarnaik, 2005)(Jacob & Winterhalter,

1970)(Eisinger, Flores, Tyson, & Shohet, 1985)(Sharma, Noble, & Ranney, 1974)(H Wajcman, Buckova, Haidas, & Labje, 1971). Desta forma a mutação pode perturbar a função, estrutura e estabilidade da proteína como comprovado pelos testes computacionais.

Esta variante está reportada na literatura, na forma heterozigótica, e apresenta-se com um quadro de anemia hemolítica severa e reticulocitose, efeito de 2,3-DPG normal, afinidade para o oxigénio aumentada e instabilidade (revelada pela precipitação em corpos Heinz). Está reportado que é possível detectar esta variante através de electroforese de citrato de agár, por HPLC de fase reversa. A Hb Köln é também conhecida como Hb San Francisco (Pacífico) e Hb Ube-1. (Pedersen et al., 1973)(Sharma et al., 1974)(H Wajcman et al., 1971) (Marengo-Rowe, 2006) (Sarnaik, 2005)(Jacob & Winterhalter, 1970) (Miranda et al., 1997)(Galacteros et al., 1989) (Horst et al., 1986) (Horst, Oehme, Kleihauer, & Kohne, 1984) (Eisinger et al., 1985)

De acordo com HbVar database estão identificadas cerca de 220 variantes  $\beta$  instáveis. No codão 98 existem mais quatro diferentes mutações descritas, na forma heterozigótica: Hb Phou Bia ( $\beta 98(\text{FG5}) \text{Val} > \text{Leu}$ ), Hb Mainz ( $\beta 98(\text{FG5}) \text{Val} > \text{Glu}$ ), Hb Djelfa ( $\beta 98(\text{FG5}) \text{Val} > \text{Ala}$ ) (G Gacon et al., 1977) (Gcrard Gacon, Wajcman, & Cosson, 1975), Hb Nottingham ( $\beta 98(\text{FG5}) \text{Val} > \text{Gly}$ ) (Gordon-Smith et al., 1973) (Brabec et al., 1994). Todas estas variantes são causadas por uma mutação que leva à distorção da cadeia globínica e consequentemente os tetrâmeros de Hb tendem a dissociar-se dentro do glóbulo vermelho, e as cadeias globínicas anormais precipitam como resultado da oxidação de grupos sulfidril expostos (Gordon-Smith et al., 1973). A Hb Phou Bia apresenta um quadro hematológico normal e é a única das quatro variantes descritas neste codão, que não tem informação acerca da sua instabilidade. A Hb Mainz é apresentada com anemia hemolítica severa e instabilidade, e é possível identificá-la

através de HPLC em fase reversa. A Hb Djelfa precipita em corpos Heinz, revela ligeira reticulocitose, efeito de Bohr normal e é possível identificá-la por IEF e HPLC de fase reversa (G Gacon et al., 1977)(Gcrard Gacon et al., 1975). A Hb Nottingham apresenta-se com um quadro de anemia hemolítica severa e reticulocitose, precipitação em corpos Heinz, dissociação do seu heme e pode ser identificada por HPLC de fase reversa (Gordon-Smith et al., 1973)(Brabec et al., 1994). Estas duas últimas variantes, Hb Djelfa e Hb Nottingham, são instáveis, apresentam elevada afinidade para o oxigênio e cooperatividade diminuída.

## **1.2. Indivíduo 2 - Hb Leiden**

O indivíduo 2 é portador da Hb Leiden (c.22\_24delGAG; pGlu6/7Stop, de acordo com HGVD), como comprovado pela realização da sequenciação dos genes globínicos  $\beta$  (Figura 10). A Hb Leiden é o resultado da deleção do resíduo de ácido glutâmico na posição 6 ou 7 da cadeia globínica  $\beta$  e tem sido descrita em várias populações, com o quadro de anemia hemolítica ligeira, reticulocitose, e instabilidade. Esta variante pode ser detectada por HPLC e a mutação pode ser confirmada por sequenciação de DNA, como realizada neste estudo (Sanguansermisri, Shimbhu, Wongvilairat, Pimsorn, & Sanguansermisri, 2003) (Rieder & James, 1976) (Schroeder et al., 1982) (Perlman, Wiltshire, Stevens, Cassel, & Lehmann, 1981).

Os grupos amino  $\alpha$  do terminal N da cadeia  $\beta$  pensam-se estar envolvidos na ligação de aniões simples e fosfatos orgânicos. A supressão do resíduo quarto ou quinto da hélice A encurta o terminal N da cadeia  $\beta$ . A Hb Leiden tem uma afinidade de oxigênio ligeiramente superior em 0,1 M de fosfato, um efeito de Bohr normal, mas uma resposta anormal para 2,3 difosfoglicerato e hexafosfato de inositol (Nagela,

Riederer, Bookchin, & G. Watson James III, 1973). A diminuição do efeito do co-factores parece ser devido a uma diminuição da força de ligação aniónica que pode ser atribuída à geometria alterada do local de ligação aniónica (Bonaventura, Bonaventura, Amiconi, Antonini, & Maurizio Brunori, 1974).

### **1.3. Indivíduo 3 - Hb Saint Louis**

Através da realização da sequenciação dos genes globínicos  $\beta$  foi possível identificar a variante Hb Saint Louis (c.86T>A; pLeu29Gln, de acordo com HGVD) na forma heterozigótica no indivíduo 3. O resíduo de leucina no codão 28 (B10) da cadeia globínica  $\beta$  está localizado numa posição interna, perto do grupo heme (Cohen-Solal, Seligmann, Thillet, & Rosa, 1973). O resíduo de leucina tem uma cadeia lateral alifática não cíclica, que confere a este resíduo carga neutra a pH 7.4 e propriedades apolares. Por outro lado o resíduo de glutamina tem uma cadeia lateral com um grupo amida, que confere a este resíduo carga neutra a pH 7.4 e propriedades polares (Berg et al., n.d.)(Campbell & Farrell, 2006). Os resíduos de leucina e glutamina têm em comum a carga, mas a sua polaridade diverge. As cadeias laterais de glutamina formam ligações de hidrogénio fortes quando lhe é permitido, no entanto, na cavidade do heme, quase só existem grupos hidrofóbicos não polares. A histidina distal, que estabelece uma ligação de hidrogénio com a glutamina, oscila para dentro na tentativa de fazer contacto. No entanto, os dois grupos estão muito afastados, para formar uma boa ligação sem a introdução de grandes distorções nas hélices. Este problema é resolvido pela introdução de uma molécula de água, que leva à formação de duas ligações em vez de uma, produzindo uma configuração relativamente mais estável (Anderson, 1976). O espaço na cavidade do heme é muito limitada, de modo a manter moléculas de água longe do

heme. Neste caso, a posição da molécula de água localiza-se acima do local de ligação do oxigénio, num ponto em que as cadeias laterais de proteínas normalmente chegam perto do heme. Assim, este novo local é ampliado de alguma forma, em duas direcções. A metade superior do heme afasta-se para a esquerda, empurrando a asparagina  $\beta 102$ , e afasta-se para a direita e para baixo forçando a glutamina  $\beta 28$ . Com duas moléculas de água e uma cadeia lateral de glutamina enclausurada no núcleo da proteína, ocorre o desdobraimento e desnaturação de forma relativamente rápida. Desta forma a mutação pode perturbar a função, estrutura e estabilidade da proteína como comprovado pelos testes computacionais (Anderson, 1976) (S L Thein et al., 1991) (Joelle Thillet, Cohen-solal, Seligmann, & Rosa, 1976).

A Hb Saint Louis já tinha sido descrita na literatura com as características de anemia hemolítica crónica, cianose, metemoglobinemia, instabilidade (precipitação em corpos Heinz), efeito de 2,3-DPG diminuído, efeito de Bohr normal, cooperatividade diminuída e afinidade para o oxigénio aumentada. Através de IEF e HPLC de fase reversa é possível detectar esta mutação (Cohen-Solal et al., 1973). Esta Hb produz um fenótipo distinto uma vez que apresenta anemia hemolítica grave associada a metemoglobinemia (Anderson, 1976). Hb Saint Louis é distinguida de outras Hbs M devido à sua maior instabilidade e a sua capacidade para formar hemicromos (Joelle Thillet et al., 1976).

De acordo com HbVar database estão identificadas cerca de 220 variantes  $\beta$  instáveis. No codão 28 existem mais três diferentes mutações descritas, na forma heterozigótica: Hb Chesterfield ( $\beta 28$  (B10) Leu>Arg) (S L Thein et al., 1991), Hb Genova ( $\beta 28$  (B10) Leu>Pro) (Badens, Paolosso, Fossat, Wajcman, & Thuret, 2005) e Hb Chile ( $\beta 28$  (B10) Leu>Met). Todas estas variantes são instáveis. A Hb Chesterfield

está associada com um fenótipo talassémico. A Hb Genova apresenta-se com um quadro de anemia hemolítica congénita grave associada à formação de corpos Heinz nos eritrócitos, e apresenta também cooperatividade diminuída e afinidade para o oxigénio aumentada. A Hb Chile apresenta-se com um quadro de anemia hemolítica crónica ligeira e cianose (S L Thein et al., 1991).

#### **1.4. Indivíduo 4 - Hb Shepherds Bush**

Por análise das Hbs através de HPLC e IEF foi possível detectar uma variante de Hb. No caso do HPLC foi perceptível a eluição de uma variante de Hb anormal antes da eluição da Hb A<sub>0</sub> (Figura 12). A Hb A<sub>0</sub> estabelece uma interacção iónica mais forte com a coluna em relação à variante de Hb. Isto pode dever-se à introdução de um resíduo de ácido aspártico, que a pH 7.4 é negativo e por isso vai ser repellido pela coluna. Desta forma a variante de Hb anormal vai ser eluída mais rapidamente que a Hb A<sub>0</sub>. Por outro lado, na IEF visualizou-se a mobilidade electroforética da variante de Hb em direcção ao ânodo (Figura 13). O ponto isoeléctrico da variante de Hb é diferente do ponto isoeléctrico da Hb A, devido à introdução do resíduo de ácido aspártico. Através da realização da sequenciação dos genes globínicos  $\beta$ , foi possível confirmar a presença de uma variante de Hb na forma heterozigótica, mais especificamente a variante Hb Shepherds Bush (c.224G> A; pGly75Asp, de acordo com HGVD).

O resíduo de glicina no codão 74 (E18) da cadeia globínica  $\beta$  está localizado numa posição interna na superfície de uma fenda que se situa entre as hélices E e F, encontrando-se na vizinhança da cavidade do heme (Srivastava et al., 1995). O resíduo de glicina tem como cadeia lateral um átomo de hidrogénio, que lhe confere carga neutra a pH 7.4 e propriedades polares. Por outro lado, o resíduo de ácido aspártico tem

uma cadeia lateral com um grupo carboxilo, que lhe confere carga negativa a pH 7.4 e propriedades polares. Estes dois resíduos de aminoácidos diferem na carga, e no volume ocupado (Berg et al., n.d.) (Campbell & Farrell, 2006). Desta forma, a introdução de um ácido amino ionizável no interior da proteína, tal como o ácido aspártico, pode causar alguma ruptura da interacção heme-cadeia globínica. No entanto, estes resíduos também podem ser acomodados nesta posição com a cadeia lateral virada para o meio aquoso (Srivastava et al., 1995). Como comprovado pelos testes computacionais, uma mutação na posição 74 da cadeia globínica  $\beta$  pode perturbar a estabilidade da Hb.

A Hb Shepherds Bush já tinha sido descrita anteriormente com as características de anemia hemolítica ligeira, reticulocitose, formação de corpos Heinz (instabilidade), afinidade para o oxigénio aumentada, e resposta ao 2,3-DPG diminuída (White, Brain, Lorkin, Lehmann, & Smith, 1970) (May & Huehns, 1972). A característica de instabilidade descrita na literatura está de acordo com os testes computacionais relacionados. De acordo com HbVar database existem mais três diferentes mutações descritas neste codão, na forma heterozigótica: Hb Aalborg ( $\beta$ 74 (E18) Gly>Arg) (Williamson et al., 1990), Hb Kokomo ( $\beta$ 74(E18) Gly>Ser) e Hb Bushwick ( $\beta$ 74(E18) Gly>Val) (Srivastava et al., 1995). A Hb Aalborg apresenta as características de instabilidade (formação de corpos Heinz), anemia ligeira, e é possível detectar esta Hb por electroforese alcalina (Williamson et al., 1990). A Hb Kokomo caracteriza-se com anemia hemolítica ligeira, reticulocitose, e é possível detectar esta Hb por HPLC de troca catiónica. A Hb Bushwick foi encontrada na forma heterozigótica com características de anemia hemolítica crónica e reticulocitose, e na forma homozigótica com anemia hemolítica crónica severa. O resíduo de valina introduzido nesta variante compromete a integridade da estrutura cadeia globínica-heme. Por isso em ambas as

formas, a Hb apresenta-se instável e é possível detectar esta variante através de HPLC de fase reversa (Srivastava et al., 1995).

### **1.5. Indivíduo 5 - Hb Malmö**

Por IEF foi possível detectar uma variante de Hb, uma vez que se visualizou a mobilidade electroforética da variante de Hb em direcção ao cátodo (Figura 15). O ponto isoeléctrico da variante de Hb é diferente do ponto isoeléctrico da Hb A, devido à introdução do resíduo de glutamina. A presença de uma variante de Hb, mais especificamente a Hb Malmö (c. [294C>A ou 294C>G]; pHis98Gln, de acordo com HGVD), foi comprovada por sequenciação.

O resíduo de histidina no codão 97 (FG4) da cadeia globínica  $\beta$  está localizado numa posição externa e envolvida com o contacto  $\alpha 1\beta 2$  (Rosa et al., 2007) (Adachia et al., 1984) (Giordano et al., 1996). O resíduo de histidina tem como cadeia lateral um anel imidazol, que lhe confere carga neutra/positiva e propriedades polares. Por outro lado o resíduo de glutamina tem uma cadeia lateral com um grupo amida, que confere a este resíduo carga neutra a pH 7.4 e propriedades polares (Berg et al., n.d.) (Campbell & Farrell, 2006). A histidina na posição  $\beta 97$  é um dos resíduos que está envolvido na interface  $\alpha 1\beta 2$  (e  $\alpha 2\beta 1$ ) da Hb humana. Considerando que a transição quaternária T $\rightarrow$ R envolve grandes alterações conformacionais na interface  $\alpha 1\beta 2$  (ou  $\alpha 2\beta 1$ ), a histidina da posição  $\beta 97$  pode ser um resíduo chave para a modulação da transição alostérica, e portanto para as propriedades funcionais (Rosa et al., 2007)(Adachia et al., 1984) (Giordano et al., 1996). Deste modo, substituições neste resíduo disruptam o contacto intra-hélice da histidina que provavelmente é essencial para a manutenção da forma correcta da hélice FG (Giordano et al., 1996). Como comprovado pelos testes

computacionais, uma mutação na posição 97 da cadeia globínica  $\beta$  pode perturbar a estabilidade e estrutura da Hb.

A Hb Mälmo está descrita na literatura, e caracteriza-se com eritrocitose, afinidade de oxigénio aumentada, cooperatividade e efeito de Bohr diminuídos, e efeito de 2,3-DPG e estabilidade normais, e é possível detectar esta variante de Hb através de IEF e sequenciação como revelado neste estudo (J. Thillet et al., 1977) (Zak et al., 1976). De acordo com HbVar database estão identificadas cerca de 148 variantes  $\beta$  com alta afinidade para o oxigénio, e existem mais quatro diferentes mutações descritas no codão 97, na forma heterozigótica: Hb Moriguchi ( $\beta 97(\text{FG4}) \text{His} > \text{Tyr}$ ) (Ohba, Imai, Kumada, Ohsawa, & Miyaji, 1989), Hb Santa Clara ( $\beta 97(\text{FG4}) \text{His} > \text{Asn}$ ) (Rosa et al., 2007), Hb Nagoya ( $\beta 97(\text{FG4}) \text{His} > \text{Pro}$ ) (Ohba et al., 1985), Hb Wood ( $\beta 97(\text{FG4}) \text{His} > \text{Leu}$ ) (Taketa, Huang, Libnoch, & Dessel, 1975), e Hb Nagoya [ $\beta 97(\text{FG4}) \text{His} > \text{Pro}$ ] (Ohba et al., 1985) A Hb Moriguchi apresenta um quadro hematológico, efeito de Bohr e estabilidade normais, afinidade para o oxigénio ligeiramente aumentada, e é possível detectar por IEF. A Hb Santa Clara apresenta quadro hematológico e estabilidade normais e é possível detectar por HPLC de troca catiónica. A Hb Wood apresenta-se com um quadro de eritrocitose, cooperatividade diminuída, afinidade para o oxigénio aumentada, efeito de Bohr e estabilidade normais, e é possível de detectar através de IEF. A Hb Nagoya apresenta-se com um quadro de anemia hemolítica crónica, cooperatividade diminuída, afinidade para o oxigénio aumentada e instabilidade, e é possível detectar por IEF. Os resultados da afinidade ao oxigénio e cooperatividade das Hb Wood e Hb Nagoya indicam perturbação na transição alostérica da Hb (Rosa et al., 2007).

## 1.6. Indivíduo 6 - Hb Vila Real

Por análise das Hbs através de HPLC e IEF foi possível detectar uma variante de Hb no indivíduo 6. No caso do HPLC foi perceptível a eluição de uma variante de Hb anormal depois da eluição da Hb A<sub>0</sub> (Figura 17). A Hb A<sub>0</sub> estabelecer uma interacção iónica mais fraca com a coluna em relação à variante de Hb. Isto pode dever-se à introdução de um resíduo de histidina, que a pH 7.4 é maioritariamente positiva. Desta forma a variante de Hb anormal vai ser eluída mais lentamente que a Hb A<sub>0</sub>. Por outro, na IEF não foi possível detectar nenhuma banda anormal, visualizando-se apenas uma banda com mobilidade electroforética correspondente à Hb A (Figura 18). O ponto isoeléctrico da variante de Hb é igual do ponto isoeléctrico da Hb A. A presença de uma variante de Hb, mais precisamente a Hb Vila Real (c110C> A; pPro37His, de acordo com HGVD), foi comprovada por sequenciação.

O resíduo de prolina no codão 36 (C2) da cadeia globínica  $\beta$  está localizado entre as hélices B e C, e está envolvido nos contactos  $\alpha 1\beta 2$  (Salzano et al., 2002) (Venselaar et al., 2010). O resíduo de prolina tem uma cadeia lateral alifática cíclica, que confere a este resíduo carga neutra a pH 7.4 e propriedades apolares. Este resíduo influencia de forma acentuada a arquitectura da proteína porque a sua estrutura em anel causa uma elevada restrição conformacional. Por outro lado, o resíduo de histidina tem como cadeia lateral um anel imidazol, que lhe confere carga neutra/positiva a pH 7.4 e propriedades polares (Berg et al., n.d.)(Campbell & Farrell, 2006). O resíduo de prolina tem polaridade diferente do resíduo de histidina, e ainda tem características conformacionais específicas. A substituição da prolina muda o ângulo entre estas hélices, alterando os contactos entre vários resíduos de cadeias  $\alpha 1$  e  $\beta 2$  e originando alterações nas propriedades funcionais, como uma diminuição da estabilidade molecular e um equilíbrio entre a desoxi-Hb e oxi-Hb previsivelmente deslocado um pouco para a

forma oxi-Hb (Salzano et al., 2002) (Venselaar et al., 2010) (M. Bento et al., 2000). Como comprovado pelos testes computacionais, uma mutação na posição 36 da cadeia globínica  $\beta$  pode perturbar a estabilidade da Hb.

A Hb Vila Real está descrita na literatura, e tem associadas características de eritrocitose, afinidade de oxigénio aumentada, e a sua detecção inclui o HPLC de troca catiónica (em que a Hb X elui com Hb A<sub>2</sub>) e sequenciação, tal como aconteceu neste estudo (Salzano et al., 2002). De acordo com HbVar database estão identificadas cerca de 148 variantes  $\beta$  com alta afinidade para o oxigénio, e existem mais três diferentes mutações descritas no codão 36, na forma heterozigótica: Hb Linköping ( $\beta$ 36(C2) Pro>Thr), Hb North Chicago ( $\beta$ 36(C2) Pro>Ser), Hb Sunnybrook ( $\beta$ 36(C2) Pro>Arg) e Hb Brie Comte Robert ( $\beta$ 36(C2) Pro>Ala). Todas estas variantes de Hb tem elevada afinidade para o oxigénio, e eritrocitose e em todos os casos há uma hidrofobicidade especial das cadeias globínicas  $\beta$ , uma vez que a cadeia globínica  $\beta$  anormal elui depois das cadeias globínicas  $\alpha$ , no HPLC de fase reversa, que pode significar mudanças conformacionais (M. Bento et al., 2000) (Salzano et al., 2002). A Hb Linköping apresenta-se ainda um quadro de instabilidade moderada. A Hb Sunnybrook apresenta efeito de Bohr ligeiramente alterado. A Hb Brie Comte Robert apresenta efeito de 2,3-DPG, efeito de Bohr e efeito de inositolfosfato normais, e cooperatividade diminuída.

### **1.7. Indivíduo 7 - Hb San Diego**

Por HPLC foi possível detectar uma variante de Hb no indivíduo 7. Verificou-se a eluição de uma variante de Hb anormal antes da eluição da Hb A<sub>0</sub>. A Hb A<sub>0</sub> estabelecer uma interação iónica mais forte com a coluna em relação à variante de Hb.

Isto pode dever-se à introdução de um resíduo de metionina. A presença de uma variante de Hb, mais especificamente a Hb San Diego, foi comprovada por sequenciação.

O resíduo de valina no codão 109 (G11) da cadeia globínica  $\beta$  está localizado numa posição interna. Este resíduo tem como cadeia lateral um grupo hidrocarbonado alifático grande, que confere a este resíduo carga neutra a pH 7.4 e propriedades apolares. Por outro lado, o resíduo de metionina tem como cadeia lateral um grupo hidrocarbonado largo com um grupo tioéter, que confere a este resíduo carga neutra a pH 7.4 e propriedades apolares (Berg et al., n.d.)(Campbell & Farrell, 2006). Os resíduos de valina e metionina têm em comum a carga e a polaridade, no entanto o resíduo de metionina tem na sua cadeia lateral um átomo de enxofre. A posição da mutação não é crítica para a função da proteína, no entanto o resíduo de asparagina da posição  $\beta$ 108 está localizado no contacto  $\alpha$ 1 $\beta$ 1, importante no estado de desoxi-Hb. Desta forma a mutação que ocorre no codão 109 pode interferir com o resíduo vizinho e condicionar o contacto  $\alpha$ 1 $\beta$ 1. Por outro lado, a cadeia lateral do resíduo na posição  $\beta$ 109 age como um espaçador entre a hélice G da cadeia  $\beta$  e as hélices B da cadeia  $\beta$  e H da cadeia  $\alpha$ . Este contacto com a hélice H da cadeia  $\alpha$  é parte da interface da subunidade  $\alpha$ 1 $\beta$ 1. A substituição que caracteriza esta variante ainda perturba directamente três resíduos: tirosina  $\beta$ 35(C1) e histidina  $\alpha$ 122(H5), e cisteína  $\beta$ 112(G14). A cisteína  $\beta$ 112 move-se em direcção à cadeia lateral da metionina, enquanto que a tirosina  $\beta$ 35 e a histidina  $\alpha$ 122 projectam-se mais para cima, relativamente ao resíduo de valina. Os resíduos  $\beta$ 112 e  $\beta$ 35 estão envolvidos com os contactos  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 (Nute, Stamatoyannopoulos, Hermodson, & Roth, 1974) (Anderson, 1974). Como comprovado pelos testes computacionais, uma mutação na posição 109 da cadeia globínica  $\beta$  pode perturbar a estabilidade da Hb.

A Hb San Diego está descrita na literatura com um quadro de eritrocitose, efeito de Bohr e estabilidade normais, cooperatividade diminuída e afinidade para o oxigénio aumentada (Nute et al., 1974)(Anderson, 1974). De acordo com HbVar database estão identificadas cerca de 148 variantes  $\beta$  com alta afinidade para o oxigénio, e existe mais uma diferente mutação descrita no codão 109, na forma heterozigótica: Hb Johnstown ( $\beta$ 109(G11) Val>Leu) (Petrides, Beykirch, & Kohne, 2008)(Ropero et al., 2000). A Hb Johnstown é caracterizada por eritrocitose e alta afinidade para o oxigénio.

### **1.8. Indivíduos 8 e 9 - Hb S**

O indivíduo 8 apresentava um quadro hematológico normal. Por análise das Hbs através de HPLC e IEF foi possível detectar uma variante de Hb. No caso do HPLC foi perceptível a eluição de uma variante de Hb anormal depois da eluição da Hb A<sub>0</sub>, e no tempo de retenção característico de Hb S (Figura 21). A Hb A<sub>0</sub> estabelece uma interacção iónica mais fraca com a coluna em relação à variante de Hb. Isto pode dever-se à introdução de um resíduo de valina. Por outro lado, na IEF visualizou-se uma banda a mobilidade electroforética de variante de Hb em direcção ao cátodo, característica da Hb S, e uma banda com mobilidade electroforética característica da Hb A (Figura 22). O ponto isoeléctrico da variante de Hb é diferente do ponto isoeléctrico da Hb A, devido à introdução do resíduo de valina. Os testes de solubilidade também confirmaram a presença de Hb S em heterozigotia. A presença de uma variante de Hb, mais especificamente a Hb S (c.20A> T; pGlu7Val, de acordo com HGVD), em heterozigotia foi comprovada por sequenciação (Figura 23). Através do tratamento dos resultados do PCR em tempo real, no programa REST 2009, foi obtido o rácio do mRNA  $\alpha/\beta$  de 0,71.

O rácio de mRNA  $\alpha/\beta$  de indivíduos normais foi obtido e variou entre 0,93 e 1,28. O rácio de mRNA  $\alpha/\beta$  de indivíduos com talassémia  $\beta$  minor variou entre 1,36 e 1,9, com talassémia  $\beta$  intermédia varia entre 1,81 e 4,81. Nas talassémias  $\alpha$ , o rácio de mRNA  $\alpha/\beta$  de indivíduos com deleção alfa 3.7 em heterozigotia variou entre 0,42 e 0,49, com deleção alfa 3.7 em homozigotia variou entre 0,38 e 0,39 e o valor médio para indivíduos com Hb H é de 0,07.

O rácio do mRNA para a Hb S em heterozigotia não era o esperado, uma vez que as variantes estruturais de Hb não têm a síntese das cadeias alterada, salvo variantes estruturais talassémicas. No entanto o resultado pode ser explicado pelo facto da Hb ser instável e estar degradada.

O indivíduo 9 apresentava um quadro hematológico de anemia e reticulocitose. Este padrão foi indicativo de uma possível presença de uma variante de Hb instável. Por análise das Hbs através de HPLC e IEF foi possível detectar uma variante de Hb. No caso do HPLC foi perceptível a eluição de uma variante de Hb anormal depois da eluição da Hb A<sub>0</sub>, no tempo de retenção característico de Hb S e com níveis muito elevados (Figura 24). A Hb A<sub>0</sub> estabelece uma interacção iónica mais fraca com a coluna em relação à variante de Hb. Isto pode dever-se à introdução de um resíduo de valina. Verificou-se ainda níveis de Hb F e de Hb A<sub>2</sub> elevados. A quantificação destes picos indicou a presença de Hb S em homozigotia. A Hb F encontrava-se elevada provavelmente devido ao facto do indivíduo tomar hidroxiureia no tratamento da drepanocitose. Por outro lado, na IEF visualizou-se uma banda com mobilidade electroforética de variante de Hb em direcção ao cátodo, característica da Hb S (Figura 25). O ponto isoeléctrico da variante de Hb é diferente do ponto isoeléctrico da Hb A, devido à introdução do resíduo de valina. Os testes de solubilidade também confirmaram a presença de Hb S em heterozigotia. A presença de uma variante de Hb,

mais precisamente a Hb S (c.20A>T; pGlu7Val, de acordo com HGVD) em homozigotia foi comprovada por sequenciação. Os resultados do PCR em tempo real do indivíduo 9 foram computorizados no REST 2009 e obteve-se o rácio mRNA  $\alpha/\beta$  revelou de 0,69. Tal como no indivíduo 8, o rácio do mRNA  $\alpha/\beta$  para a Hb S em homozigotia não era o esperado, uma vez que as variantes estruturais de Hb não têm a síntese das cadeias alterada, salvo variantes estruturais talassémicas. No entanto o resultado pode ser explicado pelo facto de a Hb ser instável, e estar degradada.

A variante Hb S tem origem na substituição de um resíduo de ácido glutâmico por um de valina. O resíduo de ácido glutâmico no codão 6 (A3) da cadeia globínica  $\beta$  está localizado numa posição externa, numa hélice  $\alpha$ . O resíduo de ácido glutâmico tem uma cadeia lateral com um grupo carboxilo, que lhe confere carga negativa a pH 7.4 e propriedades polares. Por outro lado, o resíduo de valina tem como cadeia lateral um grupo hidrocarbonado alifático grande, que confere a este resíduo carga neutra a pH 7.4 e propriedades apolares (Berg et al., n.d.)(Campbell & Farrell, 2006). Os resíduos de ácido glutâmico e valina divergem tanto na carga como na polaridade, e o resíduo de valina é incompatível com a hélice  $\alpha$ . Desta forma, a Hb S polimeriza na conformação desoxigenada, que favorece as interações hidrofóbicas entre cada cadeia e as suas adjacentes, ocorrendo polímeros insolúveis. Existem outros resíduos na cadeia  $\beta$  que participam neste processo. A interação da valina na posição 6 com a fenilalanina na posição 85, e a leucina na posição 88 na sua cadeia par é estereoquimicamente indisponível na oxi Hb (Marengo-Rowe, 2006) (Jorge et al., 2012) (Geva et al., 2004). A Hb S reduzida forma um gel viscoso semi-sólido, que consiste em muitos filamentos finos dispostos paralelamente uns aos outros (tactóides). A formação de polímeros dentro do glóbulos vermelhos provoca uma mudança da sua forma para a forma de foice que dá o seu nome à doença. A falcização é acompanhada pelo aumento da rigidez,

perda de deformabilidade, aumento da adesividade a células endoteliais e danos na membrana dos glóbulos vermelhos. Todas estas consequências afectam adversamente as propriedades de fluxo dos glóbulos vermelhos. Isto produz vaso-oclusão, que configura um ciclo vicioso de estagnação, baixa pO<sub>2</sub> nos tecidos, acidose tecidual, aumento da viscosidade, formação de polímeros e mais vaso-oclusão para completar e perpetuar o ciclo. Os danos na membrana provoca diminuição do tempo de vida dos glóbulos vermelhos (15 dias em vez de 120 dias), resultando em anemia hemolítica crónica (Bird, 1972) (Sarnaik, 2005) (D J Weatherall & Clegg, 2001) (Jorge et al., 2012). Como comprovado pelos testes computacionais, uma mutação na posição 6 da cadeia globínica  $\beta$  pode perturbar a estabilidade da Hb.

A Hb S está descrita na literatura. Em heterozigotia, os indivíduos são normais a nível clínico. Em homozigotia, os indivíduos apresentam um quadro de anemia hemolítica de gravidade variada (Hartwell et al., 2005) (Breda et al., 2009) (Clarke & Higgins, 2000) (Emery et al., 2002) (Okoli, Irani, & Horvath, 2009) (Akinsheye et al., 2011). Os níveis aumentados de Hb F melhoram o quadro clínico, uma vez que tem o efeito de antipolimerização, pois impede que a formação de polímeros na desoxi-Hb (Akinsheye et al., 2011). As características reportadas na literatura estão em concordância com os resultados obtidos.

De acordo com HbVar database existem mais doze mutações descritas com características semelhantes à Hb S na cadeia globínica  $\beta$ . Estas Hbs têm uma dupla mutação ( $\beta 6$  Glu→Val e outra substituição de resíduo aminoácido na mesma cadeia globínica  $\beta$ ) (Jorge et al., 2012), que induzem falcização e geralmente assume-se que estas variantes com dupla substituição resultam de *crossing over* entre cromossomas que têm a mutação Hb S e a segunda substituição (Tabela 26). Estas variantes de Hb são: Hb S-South End ( $\beta 6(A3)$  Glu>Val AND  $\beta 132(H10)$  Lys>Asn), Hb S-Antilles

( $\beta 6(A3)$  Glu>Val AND  $\beta 23(B5)$  Val>Ile) (Romana, Gerard, Chout, Krishnamoorthy, & Marianne-Penin, 2002) (Fabry et al., 1995), Hb S-Clichy ( $\beta 6(A3)$  Glu>Val AND  $\beta 8(A5)$  Lys>Thr) (Zanella-Cleon et al., 2009), Hb S-San Martin ( $\beta 6(A3)$  Glu>Val AND  $\beta 105(G7)$  Leu>Pro), Hb Jamaica Plain ( $\beta 6(A3)$  Glu>Val AND  $\beta 68(E12)$  Leu>Phe), Hb C-Ndjamena ( $\beta 6(A3)$  Glu>Val AND  $\beta 37(C3)$  Trp>Gly) (Bouزيد et al., 2011), Hb S-Oman ( $\beta 6(A3)$  Glu>Val AND  $\beta 121(GH4)$  Glu>Lys) (Nagel et al., 1998), Hb C-Ziguinchor ( $\beta 6(A3)$  Glu>Val AND  $\beta 58(E2)$  Pro>Arg) (Goossens et al., 1975), Hb C-Harlem ( $\beta 6(A3)$  Glu>Val AND  $\beta 73(E17)$  Asp>Asn) (Adachi et al., 2003)(Bookchin, Nagel, & Ranney, 1967), Hb S-São Paulo ( $\beta 6(A3)$  Glu>Val AND  $\beta 65(E9)$  Lys>Glu) (Jorge et al., 2012), Hb S-Providence ( $\beta 6(A3)$  Glu>Val AND  $\beta 82(EF6)$  Lys>Asn), Hb S-Travis ( $\beta 6(A3)$  Glu>Val AND  $\beta 142(H20)$  Ala>Val) (Moo-penn et al., 1977), Hb S-Cameroon ( $\beta 6(A3)$  Glu>Val AND  $\beta 90(F6)$  Glu>Lys), Hb Porto Alegre ( $\beta 6(A3)$  Glu>Val AND  $\beta 9(A6)$  Ser>Cys) (Lojo, Santiago-Borrero, Rivera, Renta, & Cadilla, 2011) (Tondo, Salzano, & Rucknagel, 1963). Todas estas variantes apresentam baixa solubilidade em condições desoxi (Geva et al., 2004). A Hb C-Harlem produz células falciformes pelo mesmo mecanismo da Hb S (Bird, 1972). Algumas Hbs como a Hb S-Antilles, Hb S-South End, Hb Jamaica Plain, Hb S-Sao Paulo apresentam baixa afinidade para o oxigénio, podem melhorar a polimerização da variante Hb S, e levam a manifestações da doença falciforme mesmo em simples heterozigóticos (Jorge et al., 2012)(Fabry et al., 1995). Ao contrário, algumas Hbs como a Hb S-Travis Hb S-Providence têm elevada afinidade para o oxigénio (Moo-penn et al., 1977). Heterozigóticos de Hb C-Ziguinchor, Hb C-Harlem, Hb S-Oman de Hb S-Travis apresentam comportamento assintomático. No entanto, duas variantes que causam falcização em heterozigóticos, Hb S-Antilles e Hb Jamaica Plain, apresentam os quadros de anemia moderada e severa, respectivamente (Jorge et al., 2012).

**Tabela 26 – Exemplos de variantes de Hb com a mutação correspondente à Hb S e outra substituição de aminoácido na cadeia globínica  $\beta$  (Zanella-Cleon et al., 2009).**

Nome	Substituições de aminoácidos	Fenótipo
Hb S-Antilles: Hb S + Hb Saveh	$\beta 6$ (A3) Glu→Val $\beta 23$ (B5) Val→Ile	Doença e falcização para heterozigóticos e em combinação com Hb C
Hb C-Ziquinchor: Hb S + Hb Dhofar	$\beta 6$ (A3) Glu→Val $\beta 58$ (E2) Pro→Arg	Assintomático
Hb C-Harlem: Hb S + Hb G-Accra	$\beta 6$ (A3) Glu→Val $\beta 73$ (E17) Asp→Asn	Anemia de células falciformes em combinação com Hb S
Hb S-Providence: Hb S + Hb Providence	$\beta 6$ (A3) Glu→Val $\beta 82$ (EF6) Lys→Asn	Assintomático
Hb S-Oman: Hb S + Hb O-Arab	$\beta 6$ (A3) Glu→Val $\beta 121$ (GH4) Glu→Lys	Assintomático ou anemia de células falciformes ligeira
Hb S-Travis: Hb S + Hb não reportada	$\beta 6$ (A3) Glu→Val $\beta 142$ (H20) Ala→Val	Assintomático
Hb Jamaica Plain: Hb S + Hb Loves Park	$\beta 6$ (A3) Glu→Val $\beta 68$ (E12) Leu→Phe	Anemia severa
Hb S-Cameroon: Hb S + Hb Agenogi	$\beta 6$ (A3) Glu→Val $\beta 90$ (F6) Glu→Lys	Assintomático
Hb S-South End: Hb S + Hb Yamagata	$\beta 6$ (A3) Glu→Val $\beta 132$ (H10) Lys→Asn	Assintomático (?)
Hb C-Ndjamena: Hb S + Hb Howick	$\beta 6$ (A3) Glu→Val $\beta 37$ (C3) Trp→Gly	Anemia das células falciformes em combinação com Hb S
Hb San Martin: Hb S + Hb não reportada	$\beta 6$ (A3) Glu→Val $\beta 85$ (F1) Phe→Leu	Anemia hemolítica crónica em heterozigóticos
Hb S-Clichy: Hb S + Hb Rio Grande	$\beta 6$ (A3) Glu→Val $\beta 8$ (A5) Lys→Thr	Assintomático

## 1.9. Indivíduo 10 - Hb C

Por análise das Hbs através de HPLC e IEF foi possível detectar uma variante de Hb no indivíduo 10. No caso do HPLC foi perceptível a eluição de uma variante de Hb anormal depois da eluição da Hb A<sub>0</sub>, no tempo de retenção característico da Hb C (Figura 27). A Hb A<sub>0</sub> estabelece uma interacção iónica mais fraca com a coluna em relação à variante de Hb. Isto pode dever-se à introdução de um resíduo de lisina, que a pH 7.4 é positivo. Desta forma a variante de Hb anormal vai ser eluída mais lentamente que a Hb A<sub>0</sub>. Por outro lado, na IEF visualizou-se a mobilidade electroforética de uma variante de Hb em direcção ao cátodo, característica de Hb C (Figura 28). O ponto isoeléctrico da variante de Hb é diferente do ponto isoeléctrico da Hb A, devido à introdução do resíduo de lisina. A presença de uma variante de Hb, mais especificamente a Hb C (c.19G> A; pGlu7Lys, de acordo com HGVD), foi comprovada por sequenciação.

O resíduo de ácido glutâmico no codão 6 (A3) da cadeia globínica  $\beta$  está localizado numa posição externa. Este resíduo tem uma cadeia lateral com um grupo carboxilo, que lhe confere carga negativa a pH 7.4 e propriedades polares. Por outro lado o resíduo de lisina tem uma cadeia lateral com um grupo amino, que lhe confere carga positiva a pH 7.4 e propriedades polares (Berg et al., n.d.) (Campbell & Farrell, 2006). Uma vez que estes resíduos possuem carga oposta a pH fisiológico, podem ocorrer mudanças na estrutura da proteína (Bird, 1972) (Giménez et al., 2009) (Vekilov et al., 2002). Os contactos realizados pelo ácido glutâmico são comprometidos, e as interacções moleculares que a lisina vai estabelecer vão alterar a estrutura da Hb. A interacção electrostática entre a Hb carregada positivamente (Hb C) e as proteínas do interior da membrana dos glóbulos vermelhos carregadas negativamente levam ao efluxo de K<sup>+</sup> causando a desidratação celular por redução drástica do conteúdo de água

dos eritrócitos. A Hb C em condições fisiológicas é menos solúvel que a Hb A, e portanto ocorre a formação de cristais intracelularmente (Das & Talukder, 2002) (Hartwell et al., 2005) (Giménez et al., 2009). Como comprovado pelos testes computacionais, uma mutação na posição 6 da cadeia globínica  $\beta$  pode perturbar a estabilidade da Hb.

A Hb C está descrita na literatura com quadro de anemia hemolítica ligeira, presença de células alvo e cristais intraeritrócitos, na forma homozigótica. Na forma heterozigótica esta variante apresenta-se com microcitose e células alvo, e é possível ser identificada por HPLC de troca catiónica e sequenciação, como foi verificado pelos resultados deste estudo (Bird, 1972)(Fairhurst & Casella, 2004) (Sarnaik, 2005) (Clarke & Higgins, 2000) (Giménez et al., 2009) (Kohne & Kleihauer, 2010) (Kohne, 2011)(Nagababu, Fabry, Nagel, & Rifkind, 2008) (Fairhurst & Casella, 2004) (Vekilov et al., 2002).

De acordo com HbVar database existem mais 4 variantes  $\beta$  com as mesmas características da Hb C. Estas Hbs têm uma dupla mutação ( $\beta 6$  Glu $\rightarrow$ Lys e outra substituição de resíduo aminoácido na mesma cadeia globínica  $\beta$ ): Hb Arlington Park ( $\beta 6(A3)$  Glu>Lys AND  $\beta 95(FG2)$  Lys>Glu), Hb C-Rothschild ( $\beta 6(A3)$  Glu>Lys AND  $\beta 37(C3)$  Trp>Arg), Hb Kingsbury ( $\beta 6(A3)$  Glu>Lys AND  $\beta 98(FG5)$  Val>Met), Hb C-New Cross ( $\beta 6(A3)$  Glu>Lys AND  $\beta 83(EF7)$  Gly>Asp). A Hb Arlington Park apresenta um quadro clínico normal. A Hb C-Rothschild apresenta um quadro de instabilidade. A Hb Kingsbury apresenta-se com um quadro de anemia ligeira, microcitose e instabilidade. Por fim, a Hb C-New Cross tem um quadro clínico normal, no entanto apresenta instabilidade.

### **1.10. Indivíduo 11 - Hb D-Punjab**

O indivíduo 11 apresentava microcitose e reticulocitose. Por análise das Hbs através de HPLC e IEF foi possível detectar uma variante de Hb. No caso do HPLC foi perceptível a eluição de uma variante de Hb anormal depois da eluição da Hb A<sub>0</sub>, num tempo de retenção característico da Hb D-Punjab (Figura 30). A Hb A<sub>0</sub> estabelece uma interacção iónica mais fraca com a coluna em relação à variante de Hb. Isto pode dever-se à introdução de um resíduo de glutamina, que possui carga diferente do resíduo de ácido glutâmico. Desta forma a variante de Hb anormal vai ser eluída mais lentamente que a Hb A<sub>0</sub>. Por outro lado, na IEF visualizou-se a mobilidade electroforética da variante de Hb em direcção ao cátodo, característica da Hb D-Punjab (Figura 31). O ponto isoeléctrico da variante de Hb é diferente do ponto isoeléctrico da Hb A, devido à introdução do resíduo de glutamina, que difere do resíduo de ácido glutâmico na carga. A presença de uma variante de Hb, mais precisamente a Hb D-Punjab (c.364G>C; pGlu122Gln, de acordo com HGVD), foi comprovada por sequenciação.

O resíduo de ácido glutâmico no codão 121 (GH4) da cadeia globínica β está localizado numa posição externa. O resíduo de ácido glutâmico tem uma cadeia lateral com um grupo carboxilo, que lhe confere carga negativa a pH 7.4 e propriedades polares. Por outro lado o resíduo de glutamina tem uma cadeia lateral com um grupo amida, que confere a este resíduo carga neutra a pH 7.4 e propriedades polares (Berg et al., n.d.) (Campbell & Farrell, 2006). Este dois resíduos têm ambos propriedades polares, mas a pH fisiológico apresentam cargas diferentes. Desta forma, poderia ocorrer grandes distúrbios na molécula, no entanto a mutação não se encontra num local crítico, como comprovado pelos testes computacionais.

A Hb D-Punjab está descrita na literatura com um quadro de microcitose, hipocromia, anemia hemolítica leve, diminuição da fragilidade osmótica, e baixa

afinidade para o oxigênio, e pode ser detectada por HPLC de troca catiónica e sequenciação (Chernoff, 1958)(Taghavi Basmanj et al., 2011). Esta variante também é conhecida por Hb D Los Angeles, Hb D-Chicago, Hb D-North Carolina, D-Portugal, Hb Ok Ridge (Bird, 1972)(Vella & Lehmann, 1974)(Taghavi Basmanj et al., 2011). As características hematológicas descritas na literatura e as técnicas usadas para a detecção da Hb D-Punjab estão de acordo com os resultados obtidos.

De acordo com HbVar database existem mais quatro diferentes mutações descritas neste codão, na forma heterozigótica: Hb O-Arab ( $\beta 121(\text{GH4}) \text{Glu} > \text{Lys}$ ) (Zimmerman, O'Branski, Rosse, & Ware, 1999), Hb Beograd ( $\beta 121(\text{GH4}) \text{Glu} > \text{Val}$ ) (Ruvodic et al., 1975), Hb D-Neath ( $\beta 121(\text{GH4}) \text{Glu} > \text{Ala}$ ), Hb St. Francis ( $\beta 121(\text{GH4}) \text{Glu} > \text{Gly}$ ). A Hb O-Arab apresenta um quadro clínico em heterozigotia normal, e em homozigotia anemia ligeira e microcitose. A Hb Beograd, Hb D-Neath e Hb St Francis apresentam quadros clínicos normais.

### **1.11. Indivíduo 12 - Hb E**

O indivíduo 12 apresentava parâmetros hematológicos normais. Por HPLC foi possível detectar um pico anormalmente elevado no tempo de retenção característico da Hb A<sub>2</sub>, pressupondo-se a existência de uma variante de Hb (Figura 33). A Hb A<sub>0</sub> estabelece uma interação iónica mais fraca com a coluna em relação à variante de Hb. Isto pode dever-se à introdução de um resíduo de lisina, que a pH 7.4 é positivo. Desta forma, a variante de Hb anormal é eluída mais lentamente que a Hb A<sub>0</sub>, e falseia os níveis de Hb A<sub>2</sub>. Na sequenciação comprovou-se a presença de uma variante de Hb, mais especificamente a Hb E (c.79G>A; pGlu27Lys, de acordo com HGVD), na forma heterozigótica (Figura 34).

O resíduo de ácido glutâmico no codão 26 (B8) da cadeia globínica  $\beta$  é um resíduo invariável e está localizado numa posição externa, perto do contacto  $\alpha 1\beta 1$  (Chihchuan et al., 1981). O resíduo de ácido glutâmico tem uma cadeia lateral com um grupo carboxilo, que lhe confere carga negativa a pH 7.4 e propriedades polares. Por outro lado, o resíduo de lisina tem uma cadeia lateral com um grupo amino, que lhe confere carga positiva a pH 7.4 e propriedades polares. Uma vez que estes resíduos possuem carga oposta a pH fisiológico, e a posição na cadeia globínica está localizada perto de um contacto importante, a mutação vai causar grandes alterações, como comprovado pelos testes computacionais. A mutação que dá origem à Hb E activa um sítio de *splicing* críptico de mRNA, que resulta na síntese reduzida da cadeia  $\beta^E$  e conduz a um fenótipo de talassémia. A Hb E tem uma interface  $\alpha\beta$  enfraquecida, levando a alguma instabilidade durante as condições de grande *stress* oxidativo (Cohen et al., 2004)(Olivieri, Pakbaz, & Vichinsky, 2011)(Benz et al., 1981). O resíduo de glutamato da posição  $\beta 26$  está próximo da interface  $\alpha 1\beta 1$ , forma ligações de hidrogénio com a arginina  $\beta 30$  da hélice B e histidina  $\beta 117$  da hélice G e compensa a acumulação de carga positiva no local. A substituição por lisina resulta na perda de ligações de hidrogénio com a concomitante reorientação dos resíduos próximos histidina  $\beta 116$  e histidina  $\beta 117$ , levando à instabilidade e propensão para oxidação da Hb. A instabilidade de Hb E pode ser atribuída à perda de ligações de hidrogénio do glutamato  $\beta 26$  com arginina  $\beta 30$ , e subsequente a perda de ligação de hidrogénio com fenilalanina  $\beta 117$ . O local de *splicing* normal compete com este novo local de *splicing* oculto e consequentemente o nível de mRNA da cadeia  $\beta^E$  que sofre *splicing* correctamente é diminuído. Como resultado a Hb E é sintetizada a uma taxa reduzida e o gene globínico  $\beta^E$  produz sintomas semelhantes aos da forma ligeira de talassémia  $\beta$  (Roche et al., 2011).

A Hb E está descrita na literatura como uma variante talassémica com o fenótipo  $\beta^+$ , instabilidade e sensibilidade ao *stress* oxidativo. Em heterozigotia apresenta-se com um quadro de microcitose ligeira, e sem significado clínico, consistente com os resultados obtidos. Em homozigotia, os indivíduos são assintomáticos com anemia hemolítica ligeira, microcitose e fragilidade osmótica reduzida. No HPLC de troca catiónica esta variante é eluída no mesmo tempo de retenção da Hb A2, e é possível confirmar a presença da variante em questão por sequenciação dos genes globínicos  $\beta$ , consistente com os resultados obtidos neste estudo (Cohen et al., 2004) (Olivieri et al., 2011) (Benz et al., 1981).

Segundo a HbVar database estão descritas na literatura cerca de 25 variantes  $\beta$  talassémicas: Hb Malay ( $\beta$ 19(B1) Asn>Ser), Hb Knossos ( $\beta$ 27(B9) Ala>Ser), Hb Cheterfield ( $\beta$ 28(B10) Leu>Arg), Hb Monroe ( $\beta$ 30(B12) Arg>Thr), Hb Medicine Lake ( $\beta$ 98(FG5) Val>Met AND  $\beta$  32(B14) Leu>Gln), Hb Cagliari ( $\beta$ 60(E4) Val>Glu), Hb Showa-Yakushiji ( $\beta$ 110(G12) Leu>Pro), Hb Durham-N.C. ( $\beta$ 114(G16) Leu>Pro), Hb Hradec Kralove (ou Hb HK) ( $\beta$ 115(G17) Ala>Asp), Hb Dhonburi ( $\beta$ 126(H4) Val>Gly), Hb Antalya ( $\beta$ 2 - 5 His-Leu-Thr-Pro replaced with His-Ser-Asp-Ser), Hb Agnana ( $\beta$ 94(+TG); modified C-terminal sequence), Hb Jambol ( $\beta$  nts 1046 - 1357 deleted AND nts AATATATTTTTAATATACTTTTT inserted between nts 1030 and 1031 of  $\beta$  AND nts CAGGTGCCATCTGTCACCCTTTTCTTTG inserted between nts 1045 and 1358 of  $\beta$ ), Hb Geneva ( $\beta$  114 (-CT); modified C-terminal sequence AND  $\beta$  114(+G); modified C-terminal sequence), Hb Manhattan ( $\beta$ 109 (-G); modified C-terminal sequence: (109)Cys-Trp-Ser-Val-Cys-Trp-Pro-Ile-Thr-Leu-Ala-Lys-Asn-Ser-Pro-His-Gln-Cys-Arg-Leu-Pro-Ile-Arg-Lys-Trp-Trp-Leu-Val-Trp-Leu-Met-Pro-Trp-Pro-Thr-Ser-Ile-Thr-Lys-Leu-Ala-Phe-Leu-Leu-Ser-Asn-Phe-(156)Tyr-COOH), Hb Sainte Seve ( $\beta$ 118 (-T); modified C-terminal sequence: (118)Leu-Ala-Lys-Asn-Ser-Pro-His-Gln-

Cys-Arg-Leu-Pro-Ile-Arg-Lys-Trp-Trp-Leu-Val-Trp-Leu-Met-Pro-Trp-Pro-Thr-Ser-Ile-Thr-Lys- Leu-Ala-Phe-Leu-Leu-Ser-Asn-Phe-(156)Tyr-COOH)), Hb Makabe ( $\beta$  123 (-A); modified C-terminal sequence: (123)Pro-His-Gln-Cys-Arg-Leu-Pro-Ile-Arg-Lys-Trp-Trp-Leu-Val-Trp-Leu-Met-Pro-Trp-Pro-Thr-Ser-Ile-Thr-Lys-Leu-Ala-Phe-Leu-Leu- Ser-Asn-Phe-(156)Tyr-COOH)), Hb Vercelli ( $\beta$  126 (-T); modified C-terminal sequence: (126)Gly-Arg-Leu-Pro-Ile-Arg-Lys-Trp-Trp-Leu-Val-Trp-Leu-Met-Pro-Trp-Pro-Thr-Ser-Ile-Thr-Lys-Leu-Ala-Phe-Leu-Leu-Ser-Asn-Phe-(156)Tyr-COOH)), Hb Stara Zagora ( $\beta$ 137(H15) - 139(H17) Val-Ala-Asn->0 AND inserted Asp)), Hb Florida ( $\beta$ 141 (-C); modified C-terminal sequence: (141)Trp-Pro-Thr-Ser-Ile-Thr-Lys-Leu-Ala-Phe- Leu-Leu-Ser-Asn-Phe-(156)Tyr-COOH)), Hb Kenya ( $A\gamma$ - $\beta$  hybrid ( $A\gamma$  through 80;  $\beta$  from 87)), Hb Lepore-Hollandia ( $\delta$ - $\beta$  hybrid ( $\delta$  through 22;  $\beta$  from 50)), Hb Lepore-Baltimore ( $\delta$ - $\beta$  hybrid ( $\delta$  through 50;  $\beta$  from 86)), Hb Lepore-Boston-Washington ( $\delta$ - $\beta$  hybrid ( $\delta$  through 87;  $\beta$  from 116)). A maioria destas variantes apresenta taxas reduzidas de síntese de mRNA do gene  $\beta$ , conseqüentes do mesmo mecanismo da Hb E, e fenótipo semelhante a talassémias  $\beta$  (Benz et al., 1981).

De acordo com HbVar database existem mais sete diferentes mutações descritas no codão 26: Hb T-Cambodia ( $\beta$ 26 (B8) Glu>Lys AND  $\beta$ 121 (GH4) Glu>Gln), Hb Corbeil ( $\beta$ 26 (B8) Glu>Lys AND  $\beta$ 104 (G6) Arg>Thr), Hb King's Mill ( $\beta$ 26 (B8) Glu>Gln), Hb Aubenas ( $\beta$ 26 (B8) Glu>Gly), Hb Henri Mondor ( $\beta$ 26 (B8) Glu>Val), Hb Tripoli ( $\beta$ 26 (B8) Glu>Ala), e Hb Marijampolé ( $\beta$ 26 (B8) Glu>Asp). A Hb T-Cambodia é instável e apresenta-se com microcitose, na forma heterozigótica. A Hb Corbeil, Hb King's Mill e a Hb Marijampolé apresentam parâmetros hematológicos normais. A Hb Aubenas é instável. A Hb Henri Mondor é instável e apresenta-se com anemia ligeira, microcitose e hipocromia. A Hb Tripoli é apresentada com anemia, microcitose e hipocromia.

### 1.12. Indivíduo 13 - Hb Lepore-Washington-Boston

O indivíduo 13 apresentava hipocromia microcitose. Por HPLC foi possível verificar a presença de uma variante de Hb, uma vez que se visualizava dois picos antes do pico correspondente ao tempo de retenção da Hb A<sub>0</sub> (Figura 36). Dois picos foram ainda detectados no tempo de retenção característico da Hb A<sub>2</sub>. Por IEF foi possível visualizar uma banda com um ponto isoelétrico característico da Hb Lepore (Figura 37). Por MLPA comprovou-se a presença de Hb Lepore-Washington-Boston em heterozigotia. Os resultados do PCR em tempo real foram tratados no REST 2009 e obteve-se o rácio mRNA  $\alpha/\beta$  de 1,8. Este rácio comprova que na Hb Lepore ocorre um desequilíbrio da síntese das cadeias globínicas, havendo mais síntese de cadeias  $\alpha$  e menos de cadeias  $\beta$ . Assim esta variante apresenta um rácio semelhante aos talassémias  $\beta$  minor.

A Hb Lepore ( $\alpha 2\delta\beta 2$ ) é uma variante talassémica, uma vez que é estruturalmente anormal e ocorre simultaneamente a diminuição da produção das cadeias globínicas (Bird, 1972) (Clarke & Higgins, 2000). Esta variante tem uma cadeia globínica híbrida  $\delta\beta$ , em que o terminal N pertence à sequência de aminoácidos da cadeia  $\delta$  e o terminal C à sequência de aminoácidos de uma cadeia  $\beta$  (Bird, 1972) (Ribeiro et al., 1997) (Baglioni & Ventruto, 1968). Esta cadeia globínica é o produto de um gene híbrido que resulta de um cruzamento desigual entre os *loci*  $\delta$  e  $\beta$ , por causa de um desalinhamento de cromossomas homólogos durante a meiose, que conduz a uma eliminação 7,4-kb. O cromossoma Lepore tem um baixo nível de síntese da cadeia globínica  $\delta\beta$  e uma baixa produção de cadeias  $\gamma$ , resultando em um fenótipo semelhante ao da talassémia  $\beta$ , consistente com os resultados (Ribeiro et al., 1997) (Clarke & Higgins, 2000) (Baird,

Schreiner, Driscoll, & Bank, 1981) (Ostertag & Smith, 1969). Os heterozigóticos para esta variante apresentam-se com um quadro de anemia ligeira, microcitose, hipocromia, e fenótipo talassémico  $\beta^+$  (Bird, 1972) (Ribeiro et al., 1997) (Clarke & Higgins, 2000) (Baird et al., 1981) (Ostertag & Smith, 1969).

De acordo com HbVar database existem mais oito variantes híbridas ou de fusão descritas, e duas delas são também do tipo Hb Lepore, diferindo apenas no ponto de interrupção do cruzamento, Hb Kenya [ $A\gamma$ - $\beta$  hybrid ( $A\gamma$  through 80;  $\beta$  from 87)] (Rai, Alvelius, & Landin, 2002) (Kifude et al., 2007) (Kendall, Ojwang, Schroeder, & Huisman, 1973), Hb Lepore-Hollandia [ $\delta$ - $\beta$  hybrid ( $\delta$  through 22;  $\beta$  from 50)], Hb Lepore-Baltimore [ $\delta$ - $\beta$  hybrid ( $\delta$  through 50;  $\beta$  from 86)], Hb P-India [ $\beta$ - $\delta$  hybrid ( $\beta$  through 87;  $\delta$  from 116)], Hb P-Congo [ $\beta$ - $\delta$  hybrid ( $\beta$  through 22;  $\delta$  from 116)], Hb Miyada [ $\beta$ - $\delta$  hybrid ( $\beta$  through 12;  $\delta$  from 22)], Hb Parchman [ $\delta$ - $\beta$  hybrid ( $\delta$  through 12;  $\beta$  from 22) AND  $\beta$ - $\delta$  hybrid ( $\beta$  through 50;  $\delta$  from 86)], Hb Ulsan [ $G\gamma$ - $\beta$  hybrid ( $G\gamma$  through 13;  $\beta$  from 21)], Hb P-Nilotic. A Hb Kenya é uma variante talassémica em que ocorre a fusão entre o gene  $A\gamma$  e o  $\beta$ , o segmento do terminal N tem a sequência da cadeia  $\gamma$  da Hb F e o segmento do terminal carboxilo tem a sequência da cadeia  $\beta$  da Hb A. Esta variante apresenta-se com um quadro de microcitose e hipocromia ligeiras e níveis de Hb F elevados, e tem características semelhantes ao síndrome HPFH. A Hb Lepore-Hollandia e a Hb Lepore-Baltimore são ambas do tipo Hb Lepore. A Hb Lepore-Hollandia apresenta-se com anemia ligeira, microcitose, hipocromia, fenótipo talassémico  $\beta^+$  e afinidade para o oxigénio aumentada. A Hb Lepore-Baltimore apresenta-se com anemia ligeira, microcitose, hipocromia e fenótipo talassémico  $\beta^+$  (Ribeiro et al., 1997) (Clarke & Higgins, 2000) (Baird et al., 1981) (Ostertag & Smith, 1969). A Hb P-India, Hb P-Congo, Hb Miyada e Hb Parchman apresentam quadros clínicos normais. A Hb P-Nilotic apresenta elevada afinidade para o oxigénio.

### 1.13. Indivíduo 14 - Hb N-Baltimore

Os parâmetros hematológicos do indivíduo 14 encontravam-se dentro dos valores de referência. Por análise das Hbs através de HPLC foi possível confirmar a presença de uma variante de Hb, devido à presença de um pico anormal antes do pico no tempo de retenção correspondente à Hb A<sub>0</sub> (Figura 38). A Hb A<sub>0</sub> estabelece uma interação iónica mais forte com a coluna em relação à variante de Hb. Isto pode dever-se à introdução de um resíduo de ácido glutâmico, que a pH fisiológico apresenta carga negativa e desta forma vai ser repellido pela coluna. Por IEF foi possível visualizar uma banda com mobilidade electroforética mais rápida que a da Hb A, devido ao facto de ocorrer a troca de resíduo aminoácido com carga positiva para um com carga negativa, e desta forma as Hbs têm pontos isoeléctricos diferentes (Figura 39). A presença de uma variante de Hb, mais especificamente a Hb N-Baltimore (c.286A>G; pLys96Glu, de acordo com HGVD), foi comprovada por sequenciação (Figura 40).

O resíduo de lisina no codão 95 (FG2) da cadeia globínica  $\beta$  está localizado numa posição externa. O resíduo de lisina tem uma cadeia lateral com um grupo amino, que lhe confere carga positiva a pH 7.4 e propriedades polares. Por outro lado, o resíduo de ácido glutâmico tem uma cadeia lateral com um grupo carboxilo, que lhe confere carga negativa a pH 7.4 e propriedades polares. Uma vez que estes resíduos possuem carga oposta a pH fisiológico, poderia levar a mudanças na estrutura da proteína (Berg et al., n.d.) (Campbell & Farrell, 2006).

A Hb N-Baltimore está descrita na literatura como uma variante que não apresenta alterações fisiológicas no estado heterozigótico, embora a sua estrutura química seja diferente da Hb normal, tal como comprovado pelos resultados obtidos. A

detecção desta pode ser realizada por HPLC de troca catiónica, IEF e sequenciação dos genes globínicos  $\beta$ , como confirmado pelos resultados obtidos (Bonini-domingos, Silveira, Viana-baracioli, & Canali, 2003). Esta variante também é conhecida por Hb Hopkins-I, Hb Jenkins, Hb Kenwood, Hb N-Memphis.

De acordo com HbVar database existem mais duas diferentes mutações descritas neste codão, na forma heterozigótica: Hb J-Cordoba ( $\beta 95$  (FG2) Lys>Met) (Bardakdjian et al., 1988) e Hb Detroit ( $\beta 95$ (FG2) Lys>Asn) (W. Moo-Penn, Schneider, Andrian, & Das, 1978). A Hb J-Cordoba apresenta características como cooperatividade diminuída e afinidade para o oxigénio ligeiramente aumentada. Pelo contrário a Hb Detroit, como Hb N-Baltimore, apresenta características normais.

#### **1.14. Indivíduo 15 - Hb Aix les Bains**

Na análise das Hbs do indivíduo 15 através de IEF apenas se verificou uma banda que migrava como a Hb A (Figura 43). No entanto por HPLC foi possível verificar uma anomalia na largura do pico correspondente à Hb A<sub>0</sub>, embora de forma pouco perceptível (Figura 42), e por electroforese em acetato de celulose verificou-se a migração de duas bandas, uma correspondente à Hb A e outra corresponde a uma variante de Hb (Figura 44). Esta última tinha uma mobilidade electroforética em direcção ao cátodo. A análise das cadeias globínicas através AUT-PAGE apenas revelou duas bandas, uma correspondente à cadeia globínica  $\beta$  e outra à  $\alpha$  (Figura 46), e através de HPLC em fase reversa verificou-se a presença de três picos referentes às cadeias globínicas  $\beta$ ,  $\beta^x$  e  $\alpha$  (Figura 45). A cadeia globínica  $\beta$  anormal apresentava uma maior hidrofobicidade em relação à cadeia globínica  $\beta$  normal, devido ao facto de um resíduo aminoácido mais hidrofóbico. Pela sequenciação foi possível detectar a presença da

mutação CCT>CTT no codão 5 da cadeia globínica  $\beta$ . O estudos funcionais de um hemolisado do indivíduo 15 revelaram que a afinidade para o oxigênio era normal, no pH fisiológico.

O resíduo de prolina no codão 5 (A2) da cadeia globínica  $\beta$  está localizado numa posição externa, próxima do terminal N e portanto próxima do local de ligação do 2,3-DPG (Joly, Garcia, Lacan, Couprie, & Francina, 2011). O resíduo de prolina tem uma cadeia lateral alifática cíclica, que está ligada aos átomos de azoto e de carbono, e confere a este resíduo carga neutra a pH 7.4 e propriedades apolares. Este resíduo influencia de forma acentuada a arquitetura da proteína porque a sua estrutura em anel causa uma elevada restrição conformacional. Por outro lado, o resíduo de leucina tem uma cadeia lateral alifática não cíclica, que confere a este resíduo carga neutra a pH 7.4 e propriedades apolares. O resíduo de prolina e leucina têm em comum a carga e a polaridade, no entanto o resíduo de prolina tem características conformacionais específicas. Uma mutação neste resíduo pode perturbar a conformação especial como comprovado pelos testes computacionais.

Esta variante já tinha sido reportada anteriormente, na forma heterozigótica, com a característica de causar distúrbios na glicação do terminal N. Apresentava-se com 11,1 g/dL de HGB, 88 fL de MCV e  $4,06 \times 10^{12}$  de eritrócitos. A análise das Hbs por HPLC tinha revelado um pico de HbA1c anormal, e a Hb A e Hb X não estavam bem separadas. O HPLC de fase reversa tinha revelado a presença de uma cadeia globínica  $\beta^x$  ligeiramente mais hidrofóbica que a cadeia globínica  $\beta$  normal (Joly et al., 2011). Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos.

De acordo com HbVar database existem mais três diferentes mutações descritas neste codão, na forma heterozigótica: Hb Gorwihl [ $\beta 5(A2)$  Pro>Ala] (Bisse et al., 2003), Hb Tyne [ $\beta 5(A2)$  Pro>Ser] e Hb Warwickshire [ $\beta 5(A2)$  Pro>Arg] (Wilson,

Cave, Lehmann, Close, & Imit, 1984). As três variantes são instáveis e os quadros hematológicos e clínicos são normais. A mutação que causa a Hb Gorwihl não afecta nem as propriedades funcionais, nem as interacções heterotrópicas da Hb, no entanto, retarda a glicação da valina no terminal N. A substituição Pro→Ala confere uma flexibilidade na hélice e permite a extensão de dois resíduos do terminal N no eixo díade. Esta situação pode levar a um condicionamento da reacção de glucose nesses resíduos. A Hb Warwickshire apresenta afinidade para o oxigénio ligeiramente diminuída na presença de fosfatos. Isto pode ser explicado pelo facto do resíduo mutante ser carregado positivamente e levar a um aumento da capacidade de ligação a fosfatos.

## **2. Variantes não descritas**

### **2.1. Indivíduos 16 e 17 - CD 142 GCC>TTC**

O hemograma do indivíduo 16 revelava anemia e reticulocitose ligeiras, que pode significar instabilidade da Hb. Por análise das Hbs através de HPLC verificou-se um pico elevado junto do pico no tempo de retenção correspondente da Hb A<sub>0</sub> (Figura 49). A Hb A<sub>0</sub> estabelece uma interacção iónica mais fraca com a coluna em relação à variante de Hb. Isto pode dever-se à introdução do resíduo de fenilalanina, que possui uma cadeia lateral muito volumosa. Através de IEF foi possível visualizar uma banda com uma mobilidade electroforética em direcção ao cátodo, e uma banda característica da Hb A (Figura 50). A sequenciação confirmou a presença de mutação, mas especificamente a troca GCC>TTC no codão 142 da cadeia globínica β.

Na análise das Hbs por HPLC do indivíduo 17 verificou-se a eluição de quatro Hbs, eluições no tempo de retenção característico da Hb F, Hb A<sub>0</sub>, Hb A<sub>2</sub> (Figura 51). A outra eluição ocorria num tempo de retenção posterior ao característico da Hb A<sub>0</sub>. Os níveis de Hb F encontravam-se muito elevados uma vez que o indivíduo 17 era recém-nascido, e os níveis de Hb F ainda se encontram bastante elevados. O pico, que aparece logo após o tempo de retenção característico da Hb A<sub>0</sub>, levantou a suspeita da presença de uma variante de Hb. A IEF realizada revelou duas bandas com mobilidades electroforéticas características de Hb F e Hb A (Figura 52). A banda desta última apresentava-se mais pronunciada que o normal, pelo facto da mobilidade electroforética da variante de Hb ser aproximada à da Hb A. Estes resultados levantaram a suspeita da presença de variante de Hb. A progenitora (indivíduo 16) deste indivíduo revelou ser portadora de uma variante de Hb. Desta forma e devido aos resultados obtidos do indivíduo 17, era provável que este fosse portador de uma variante de Hb igual à da progenitora. Através da sequenciação dos genes globínicos  $\beta$  confirmou-se a presença da mesma variante de Hb do indivíduo 16, ou seja a mutação que resulta da troca GCC>TTC no codão 142 da cadeia globínica  $\beta$ .

O resíduo de alanina no codão 142 (H20) da cadeia globínica  $\beta$  está localizado numa posição externa, que está envolvida num inter-contacto da subunidade  $\beta$ , e a hélice H está envolvida em contactos nas interfaces  $\alpha 1\beta 1$  or  $\alpha 2\beta 2$ . O resíduo de alanina tem como cadeia lateral um grupo hidrocarbonado alifático, mais precisamente um grupo metil, que confere a este resíduo carga neutra a pH 7.4 e propriedades apolares. Por outro lado o resíduo de fenilalanina tem como cadeia lateral um grupo hidrocarbonado aromático, que confere a este resíduo carga neutra a pH 7.4 e propriedades apolares (Berg et al., n.d.)(Campbell & Farrell, 2006). Os resíduos de alanina e fenilalanina têm em comum a carga e a polaridade, no entanto o resíduo de

fenilalanina tem uma cadeia lateral muito mais volumosa, o que pode levar ao deslocamento da hélice H em relação à hélice G. O resultado da alteração na conformação da região terminal C da molécula pode ser a diminuição da estabilidade das pontes salinas das intracadeias entre o grupo imidazol do resíduo histidina  $\beta 146$  e o resíduo aspartato  $\beta 94$  (FG1). Esta ponte salina contribui para o efeito de Bohr e está envolvida na estabilização da estrutura quaternária desoxi da Hb (W. F. Moo-Penn et al., 1980). O resíduo de alanina contacta ainda com dois resíduos muito importantes funcionalmente, a leucina na posição 141 e a histidina na posição 143, um dos locais de ligação do heme e do 2,3-DPG, respectivamente, e existe uma série de resíduos distais que desempenham um papel importante nos efeitos alostéricos da molécula. A substituição ou deleção do aminoácido da posição  $\beta 141$  é acompanhada pelo aumento da tendência de perda do heme e anemia hemolítica severa. É provável que a introdução de um resíduo de fenilalanina nesta variante perturbe a configuração da hélice H e previna que o resíduo de leucina adjacente contacte com o grupo heme, levando à sua perda. A substituição de aminoácido da posição  $\beta 142$  pode ainda afectar a histidina na posição  $\beta 143$  e estender-se ao terminal C, uma vez que uma substituição na histidina na posição  $\beta 143$  é acompanhada pela incorrecta ligação do 2,3-DPG e aumento da afinidade para o oxigénio. Outro resíduo, que pode estar também condicionado pela mutação na posição  $\beta 142$ , é a tirosina da posição  $\beta 145$  que desempenha um papel chave na ligação cooperativa do oxigénio, que leva à transição alostérica do estado T para R. A introdução de um novo aminoácido na posição  $\beta 142$  pode condicionar o papel de mediador de mudanças conformacionais da tirosina, que contacta com a Val $\beta 98$  envolvida directamente com histidina proximal (Hirano et al., 1981). Desta forma, a mutação CD142 Ala $\rightarrow$ Phe, pode levar a alterações na conformação, estrutura e função da proteína, como comprovado pelos testes *in silico* e pelas *MD simulations*. Através

estas últimas foi possível visualizar a proximidade do resíduo afectado com os resíduos adjacentes e com os resíduos acima referidos, e o movimento realizado pela proteína após 100 nanosegundos (Figura 54). Também foi possível verificar que a mutação causa um ligeiro desvio do valor de distribuição de probabilidades dos ângulos de torção (Figura 55). Com estes resultados conclui-se que é provável que a mutação vá afectar a função e estrutura da Hb, embora não seja completamente perceptível.

Esta variante ainda não está reportada na literatura. De acordo com HbVar database estão identificadas cerca de 27 variantes com duas mutações pontuais em nucleótidos separados, no entanto apenas está descrita uma variante em que ocorre as substituições de dois nucleótidos no mesmo codão, a Hb Nebraska. (Hoyer, Wendt, Hogan, & Oliveira, 2011) O mecanismo de substituição de dois nucleótidos não está clarificada. Tanto pode ter acontecido simultaneamente como pode ter ocorrido como dois eventos distintos e independentes. No entanto é importante ter presente que nos casos descritos na literatura de variantes de Hb com duas substituições de nucleótidos separadas, estas ocorrem provavelmente em diferentes pontos de tempo. Assim, parece improvável que esta dupla substituição de nucleótidos ocorra como um evento de *crossing over*.

No codão 142 existem mais três diferentes mutações descritas, na forma heterozigótica: Hb Inglewood [ $\beta$ 142(H20) Ala>Thr] (Hoyer et al., 2002), Hb Toyake [ $\beta$ 142(H20) Ala>Pro] (Hirano et al., 1981) e Hb Ohio [ $\beta$ 142(H20) Ala>Asp] (W. F. Moo-Penn et al., 1980). A Hb Inglewood foi reportada com quadros clínico e hematológicos normais, e apresenta estabilidade normal (Hoyer et al., 2002). A Hb Toyake foi reportada com o quadro hematológico de anemia hemolítica crónica, apresenta as características de dissociação em subunidades, instabilidade face ao calor e isopropanol, afinidade para o oxigénio aumentada e cooperatividade diminuída. Estas

características podem dever-se ao facto da inserção do resíduo de prolina levar à disrupção da hélice. Na Hb normal, o resíduo de prolina, que é um resíduo iminoácido, está incorporado numa porção não helicoidal ou nos primeiros resíduos das hélices  $\alpha$ . No entanto, no caso da mutação referida, a prolina está inserida numa hélice  $\alpha$ . Deste modo ocorre incompatibilidade entre o resíduo de prolina e a hélice  $\alpha$  (Hirano et al., 1981). A Hb Ohio foi descrita com um quadro hematológico de eritrocitose, elevada afinidade para o oxigénio, efeito de Bohr reduzido, cooperatividade diminuída e instabilidade. A eritrocitose e a elevada afinidade para o oxigénio são devido à diminuição da estabilidade da conformação molecular T. A substituição do pequeno resíduo de alanina por um resíduo de aspartato carregado, pode alterar a conformação da região do C-terminal da cadeia polipeptídica. Na Hb Ohio desoxigenada, o aumento do volume do aspartato quando comparado com alanina (127.2 versus 89.4 Å), e a introdução da carga, pode levar ao deslocamento da hélice H em relação à hélice G (W. F. Moo-Penn et al., 1980).

## **2.2. Hb Ponta Delgada**

O quadro hematológico do indivíduo com a mutação revelava reticulocitose, o que indicava que a variante de Hb seria instável, e que se veio a comprovar através do teste de instabilidade. Por HPLC foi possível detectar um pico anormal indicativo de variante de Hb, antes da eluição da Hb A<sub>0</sub> (Figura 56). Na IEF realizada também foi possível detectar uma banda com uma mobilidade electroforética indicativa de variante de Hb em direcção ao ânodo (Figura 57), tão bem como na electroforese em acetato de celulose (Figura 58). A análise das cadeias globínicas por HPLC de fase reversa não revelou nenhum pico referente a uma cadeia globínica  $\beta$  anormal, que pode ser devido

ao facto da variante ser instável (Figura 60). Através deste HPLC foi possível obter o rácio entre as cadeias  $\alpha/\beta$ , tendo-se observado ser elevado. Este resultado pode ser explicado pelo facto da Hb anormal ser instável e já estar degradada. No entanto por AUT-PAGE foi possível visualizar a separação das cadeias globínicas normais ( $\alpha$  e  $\beta$ ) da cadeia globínica  $\beta$  variante (Figura 61). Por SDS-PAGE verificou-se que o tetrâmero da molécula era normal, pois não havia a presença de duas bandas ou mobilidade diferente, apesar da complexidade da sequência (Figura 59). Os testes de afinidade do oxigénio revelaram ser normais, indicando que a mutação não está a afectar os resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação de gases (Figura 63 e Figura 64). A sequenciação revelou a presença da mutação  $\beta 48$  (+TGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTTGGGGAT) (Figura 62), e possivelmente IVS II-26-58 (-TTCTTTCCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCAT) e uma sequência irreconhecível em *loop* IVS-60-81 (TAAAATGGGAAACATACGAATG). A natureza da inserção e deleção é a causa da instabilidade da Hb, que tende a sofrer oxidação espontânea nos glóbulos vermelhos e precipitar na forma de inclusões insolúveis designadas corpos Heinz (Marengo-Rowe, 2006).

A Hb Ponta Delgada é claramente uma variante de Hb por causa da sua cadeia globínica  $\beta$  anormal ter uma inserção de 11 codões na posição 48 (corresponde a uma duplicação da sequência de 33 bp encontrada antes da inserção), uma deleção de 33 pb na IVS II-26, e uma sequência não reconhecível de 22 pb na IVS II-60. A inserção de 10 codões ocorre entre o codão 47 (CD6) e o codão 48 (CD7), que estão localizados em posições externas. No codão 47 estão descritas Hb G-Copenhague [ $\beta 47$ (CD6) Asp>Asn], Hb Maputo [ $\beta 47$ (CD6) Asp>Tyr], Hb Maryland [ $\beta 47$ (CD6) Asp>His], Hb Avicenna [ $\beta 47$ (CD6) Asp>Ala], Hb Muravera [ $\beta 47$ (CD6) Asp>Val] e Hb Gavello [ $\beta 47$ (CD6) Asp>Gly]. A Hb Maryland apresenta-se como uma variante instável e a Hb

Muravera como uma variante com alta afinidade para o oxigénio e instável. No codão 48 estão descritas a Hb Okaloosa [ $\beta$ 48(CD7) Leu>Arg], que tem baixa afinidade para o oxigénio e é instável, e a Hb Bab-Saadoun [ $\beta$ 48(CD7) Leu>Pro] que é instável.

Esta variante ainda não está reportada na literatura. De acordo com HbVar database estão identificadas cerca de 28 variantes com deleções, 9 com inserções e apenas 5 com deleções e inserções. O mecanismo de inserção e deleção simultaneamente ainda não está clarificado. As outras variantes descritas na literatura que são o resultado de inserções e deleções simultaneamente são: Hb Martinez [ $\beta$ 49 - 55 (-TCCA~~CT~~CCTGATGCTGTTA); modified C-terminal sequence AND  $\beta$ 49 (+AGCT); modified C-terminal sequence], Hb Montreal [ $\beta$ 73(E17) - 75(E19) Asp-Gly-Leu->0 AND Ala-Arg-Cys-Gln- inserted between codons 72(E16) and 76(E20) of  $\beta$ ], Hb Antalya ( $\beta$ 2 - 5 His-Leu-Thr-Pro replaced with His-Ser-Asp-Ser), Hb Jambol ( $\beta$  nts 1046 - 1357 deleted AND nts AATATATTTTTAATATACTTTTT inserted between nts 1030 and 1031 of  $\beta$  AND nts CAGGTGCCATCTGTACCCCTTTTCTTTG inserted between nts 1045 and 1358 of  $\beta$ ), Hb Geneva [ $\beta$  114 (-CT); modified C-terminal sequence AND  $\beta$  114(+G); modified C-terminal sequence]. A Hb Martinez, Hb Antalya, Hb Jambol e Hb Geneva são variantes de Hb com fenótipo talassémico, e portanto diferem da Hb Ponta Delgada. A Hb Montreal é uma Hb instável e apresenta um quadro de anemia hemolítica moderada e reticulocitose. Por IEF não é possível ser identificada uma vez que a sua mobilidade electroforética é semelhante à da Hb D. A Hb Montreal elui mais lentamente que a Hb A<sub>2</sub>, e apresenta-se com valores de 15-20% do total de Hb.

A Hb Ponta Delgada pode ser o resultado de um novo evento genético (microindel), ainda por clarificar, uma vez que não foi realizado o estudo familiar. No entanto é conhecido que pequenas deleções e também pequenas inserções podem

resultar de deslizamento e mispairing de duas sequências homólogas de DNA durante a replicação. Isto pode resultar ou na remoção ou repetição de DNA entre estas pequenas sequências homólogas (Plaseska et al., 1991). A sequência repetitiva  $\beta$  TGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTTGGGGAT está presente nos codões 37 ao 47 do gene normal  $\beta$ . Como resultado de uma mispairing ou da recombinação ou deslizamento entre pequenas sequências repetidas, a sequência TGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTTGGGGAT aparece em duplicado no gene anormal  $\beta$ . A deleção da sequência TTCTTTCCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCAT aparece durante a subsequente reparação do DNA. A sequência não reconhecível pode ter sido resultado do mesmo processo idêntico ao da duplicação.

Há ainda a hipótese das microindels resultarem da combinação de eventos de microinserção e microdeleção, mudança da cadeia, *loops* de cadeias simples, mispairing das cadeias deslizantes. A exclusão de pares de base na cadeia molde leva a deleção, e a exclusão de pares de base na nova cadeia leva à inserção de nucleótidos. As inserções resultantes da deslizamento de nucleótidos resulta em repetições directas das bases anteriores. No entanto, é provável que muitas mutações conjuntas ocorram por diferentes mecanismos, tais como ligações cruzadas de bases duplas e outras ligações cruzadas para mutações conjuntas duplas e triplas. Especula-se também determinadas polimerases sujeitas a erros (Hill, Gonzalez, Scaringe, Wang, & Sommer, 2006). Nesta última hipótese especula-se que um aducto largo de DNA que bloqueia a replicação pela polimerase normal não é facilmente contornado, mesmo por polimerases com lesões. No modelo Tarzan (Figura 65), as helicases desenrolam os nucleótidos próximos da nova cadeia a partir da molde de modo que a polimerase com lesões, no seu progresso directo bloqueado pelo aducto, possa suportar a cadeia molde. Algumas sequências

adicionais são sintetizadas na nova cadeia constituindo a sequência inserida da microindel. Poucos nucleótidos da molde são contornados, constituindo a sequência deletada da microindel. A polimerase normal pode depois continuar com a replicação.

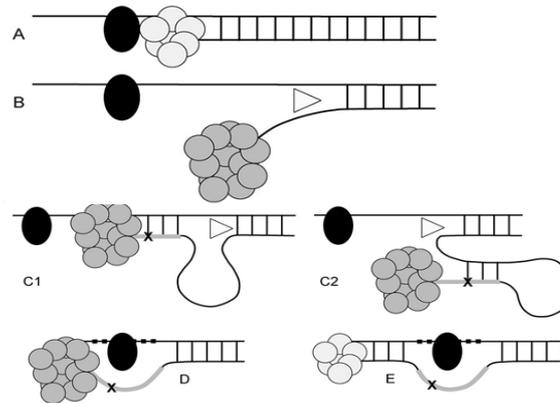


Figura 65 – Modelo Tarzan: mecanismo proposto para a formação de inserções e deleções. A replicação pela DNA polimerase normal (pequeno aglomerado de círculos) é bloqueada por um aducto largo de DNA (preto oval) no DNA molde (A). Para evitar o desvio do aducto, são recrutadas uma polimerase lesionada sujeita a erros (aglomerado largo de círculos) e uma helicase (triângulo). A polimerase lesionada é também bloqueada pelo aducto mas a helicase dissocia a nova cadeia da molde (B), permitindo à polimerase lesionada sintetizar alguns nucleótidos a partir do molde (C1) ou da nova cadeia (C2). Alguns nucleótidos adicionais são sintetizadas, às vezes com erros (X), gerando a sequência inserida da microindel (linha a tracejado). Assim, a sequência inserida é ou uma cópia *sense* (no caso C1) ou *antisense* (no caso C2), por vezes com erros, de sequências vizinhas. A helicase depois dissocia o segmento sintetizado pela polimerase lesionada a partir da cadeia molde (no caso C1) ou da nova (no caso C2). Com o tamanho adicional do DNA sintetizado, a polimerase com lesões é capaz de passar pelo aducto e preservar a célula. Este processo resulta em ignorar alguns nucleótidos no molde (D, linha grossa tracejada) resultando na parte microdeleção da microindel. Algumas das bases ignoradas (ou os seus complementos na nova cadeia no caso C2) podiam ter sido parte do molde para a sequência inserida em que caso exista sobreposição das sequências inserida e deletada da microindel. Depois o aducto é contornado, a polimerase normal pode continuar com a replicação (E) (Scaringe et al., 2008).

## **CONCLUSÃO**

De um modo geral, os resultados deste estudo permitiram a caracterização molecular de 16 variantes  $\beta$  de hemoglobina, e caracterização funcional de 2 variantes  $\beta$  de hemoglobina. Duas das variantes foram aqui descritas pela primeira vez na literatura, a Hb Ponta Delgada e a variante  $\beta$  que é causada pela substituição da alanina por fenilalanina no codão 142 da cadeia globínica  $\beta$ . A Hb Ponta Delgada é um o resultado de um tipo de mutação raro, microindels, cujo mecanismo ainda não está bem elucidado. Neste estudo conclui-se que esta nova variante apresentava instabilidade. A outra variante  $\beta$  descrita aqui pela primeira vez, pressupõe-se ser instável.

Neste trabalho conclui-se também que a técnica de PCR em tempo real é precíval de ser utilizada no rastreio de casos anormais de microcitose e hipocromia.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Para futuro, a implementação da metodologia de PCR em tempo real no Laboratório de Anemias Congénitas e Hematologia Molecular do Serviço de Hematologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, servirá para o estudo preliminar de microcitoses e hipocromias, de modo a rastrear pacientes portadores ou não de talassémias.

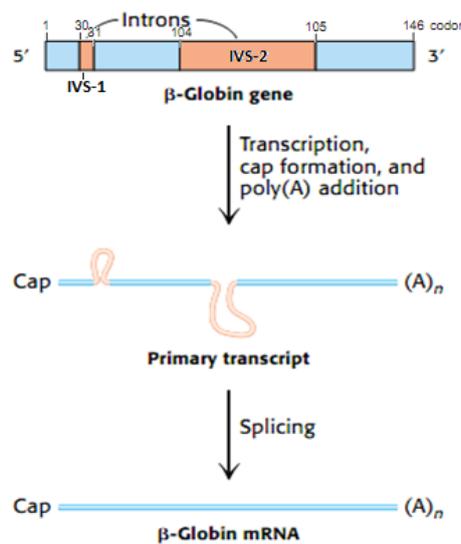
Para o caso do indivíduo portador da variante Hb Ponta Delgada, serão realizados estudos posteriores de modo a comprovar a presença de uma deleção e sequência não reconhecível.

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

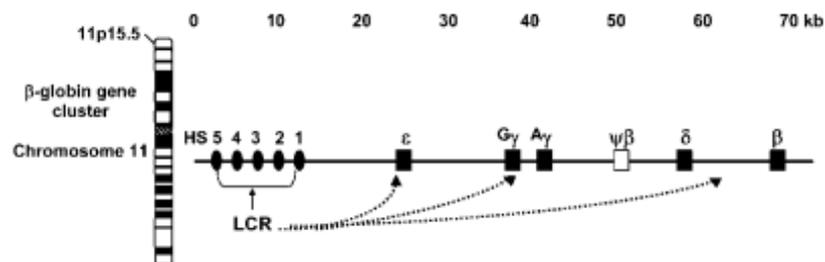
**NOTA FINAL**

Durante a realização deste trabalho, acompanhei e colaborei no estudo da identificação e caracterização molecular e funcional de variantes  $\alpha$  da Hb. Neste estudo realizei as técnicas de sequenciação de genes globínicos  $\alpha$ , PCR multiplex para a pesquisa das deleções  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$  nos genes globínicos  $\alpha$  e para a pesquisa das triplicações anti 3.7 e anti 4.2 nos genes globínicos  $\alpha$ , e MLPA para os genes globínicos  $\alpha$ . Para além da realização destas metodologias, colaborei na publicação científica como co-autora de dois artigos submetidos na revista *Hemoglobin*: “Hb Iberia [ $\alpha$ 104(G11) Cys104Arg] (HBA2:c.313T>C) , a new  $\alpha$  thalassaemic hemoglobin variant found in the Iberian Peninsula: report of six cases” e “Hb Plasencia [ $\alpha$ 2 125(H8)Leu→Arg] is a frequent cause of  $\alpha^+$  thalassemia in the Portuguese population”.

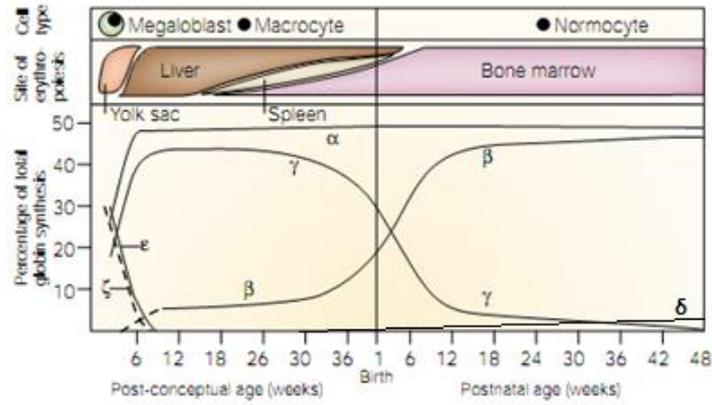
**ANEXOS**



Anexo 1 – Transcrição e processamento do gene globínico  $\beta$ . O gene é transcrito primariamente, e é modificado pela adição da cap e poli(A). As seqüências de intervenção no transcrito primário RNA são removidas para formar o mRNA. Os blocos a azul representam as regiões codificantes do gene; e os blocos a laranja representam os intrões que interrompem as seqüências codificantes dos genes, e que são seqüências não traduzíveis. Os intrões são IVS-1 e IVS-2. Os números acima do diagrama indicam as posições dos codões na seqüência codificante (Spritz & Forget, 1983)(Berg et al., n.d.).



Anexo 2 – Estrutura do agrupamento gênico globínico  $\beta$ . A interação específica de estágio entre o  $\beta$ -LCR e o agrupamento gênico está também esquematizado (Manca & Masala, 2008).



**Anexo 3 – Expressão dos genes globínicos humanos durante o desenvolvimento. Os locais da hematopoiese primitiva e definitiva ao longo do desenvolvimento estão evidenciados. As curvas sequenciais da síntese das cadeias globínicas  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , e  $\beta$  começam com a expressão da cadeia  $\epsilon$  no primeiro mês do desenvolvimento humano, seguida pela expressão da cadeia globínica  $\gamma$  no estágio fetal, e só depois do nascimento é que a síntese da cadeia globínica  $\beta$  se torna predominante nas células eritróides definitivas (D J Weatherall, 2001).**

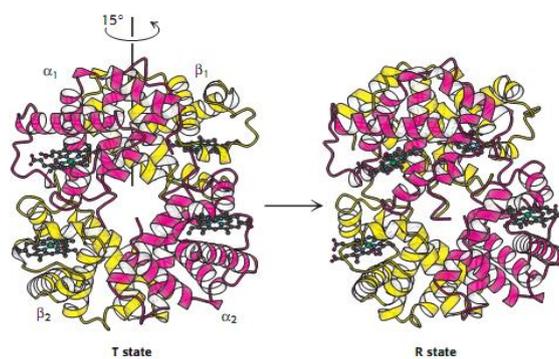
10	20	30	40	50	60
MVHLTPPEEKS	AVTALWGKVN	VDEVGGEALG	RLLVVYPWTQ	RFESFGDLS	TPDAVMGNPK
70	80	90	100	110	120
VKAHGKVLG	AFSDGLAHL	NLKGTFATLS	ELHCDKLHVD	PENFRLLGNV	LVCVLAHHFG
130	140				
KEFTPPVQAA	YQKVAVGVAN	ALAHKYH			

**Anexo 4 – Sequência de aminoácidos do gene  $\beta$  (Uniprot).**

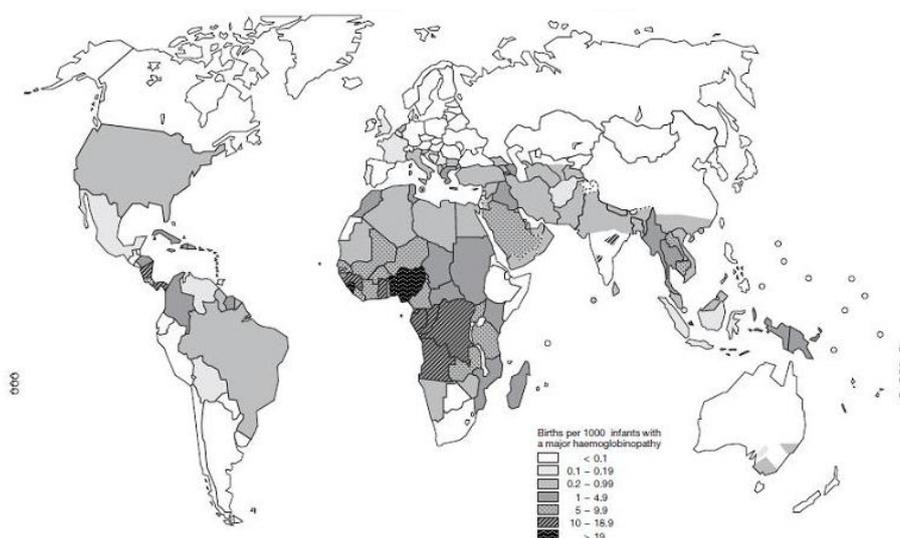
**Anexo 5 - Estrutura primária da cadeia globínica  $\beta$  (Masala & Manca, 1992).**

Resíduo	Hélice	Aminoácido	Resíduo	Hélice	Aminoácido	Resíduo	Hélice	Aminoácido
1	NA1	Val	50	D1	Thr	99	G1	Asp
2	NA2	His	51	D2	Pro	100	G2	Pro
3	NA3	Leu	52	D3	Asp	101	G3	Glu
4	A1	Thr	53	D4	Ala	102	G4	Asn
5	A2	Pro	54	D5	Val	103	G5	Phe
6	A3	Glu	55	D6	Met	104	G6	Arg
7	A4	Glu	56	D7	Gly	105	G7	Leu
8	A5	Lys	57	E1	Asn	106	G8	Leu
9	A6	Ser	58	E2	Pro	107	G9	Gly
10	A7	Ala	59	E3	Lys	108	G10	Asn
11	A8	Val	60	E4	Val	109	G11	Val
12	A9	Thr	61	E5	Lys	110	G12	Leu
13	A10	Ala	62	E6	Ala	111	G13	Val
14	A11	Leu	63	E7	His	112	G14	Cys
15	A12	Trp	64	E8	Gly	113	G15	Val
16	A13	Gly	65	E9	Lys	114	G16	Leu
17	A14	Lys	66	E10	Lys	115	G17	Ala
18	A15	Val	67	E11	Val	116	G18	His
19	B1	Asn	68	E12	Leu	117	G19	His
20	B2	Val	69	E13	Gly	118	GH1	Phe
21	B3	Asp	70	E14	Ala	119	GH2	Gly
22	B4	Glu	71	E15	Phe	120	GH3	Lys
23	B5	Val	72	E16	Ser	121	GH4	Glu
24	B6	Gly	73	E17	Asp	122	GH5	Phe
25	B7	Gly	74	E18	Gly	123	H1	Thr
26	B8	Glu	75	E19	Leu	124	H2	Pro
27	B9	Ala	76	E20	Ala	125	H3	Pro
28	B10	Leu	77	EF1	His	126	H4	Val
29	B11	Gly	78	EF2	Leu	127	H5	Gln
30	B12	Arg	79	EF3	Asp	128	H6	Ala
31	B13	Leu	80	EF4	Asn	129	H7	Ala
32	B14	Leu	81	EF5	Leu	130	H8	Tyr
33	B15	Val	82	EF6	Lys	131	H9	Gln
34	B16	Val	83	EF7	Gly	132	H10	Lys
35	C1	Tyr	84	EF8	Thr	133	H11	Val
36	C2	Pro	85	F1	Phe	134	H12	Val
37	C3	Trp	86	F2	Ala	135	H13	Ala
38	C4	Thr	87	F3	Thr	136	H14	Gly
39	C5	Gln	88	F4	Leu	137	H15	Val
40	C6	Arg	89	F5	Ser	138	H16	Ala
41	C7	Phe	90	F6	Glu	139	H17	Asn
42	CD1	Phe	91	F7	Leu	140	H18	Ala

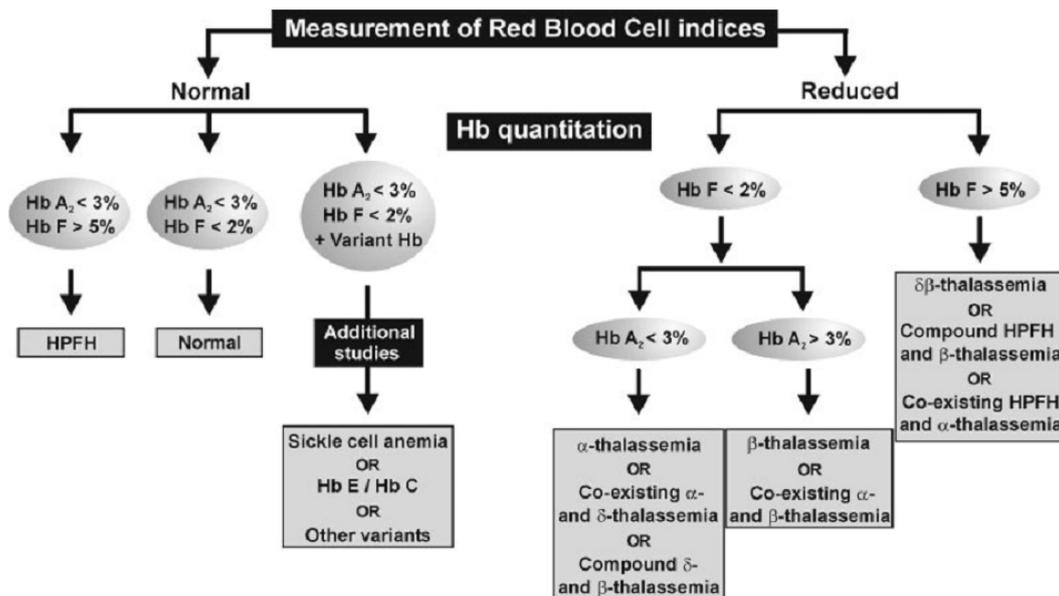
43	CD2	Glu	92	F8	His	141	H19	Leu
44	CE3	Ser	93	F9	Cys	142	H20	Ala
45	CE4	Phe	94	FG1	Asp	143	H21	His
46	CE5	Gly	95	FG2	Lys	144	HC1	Lys
47	CE6	Asp	96	FG3	Leu	145	HC2	Tyr
48	CE7	Leu	97	FG4	His	146	HC3	His
49	CE8	Ser	98	FG5	Val			



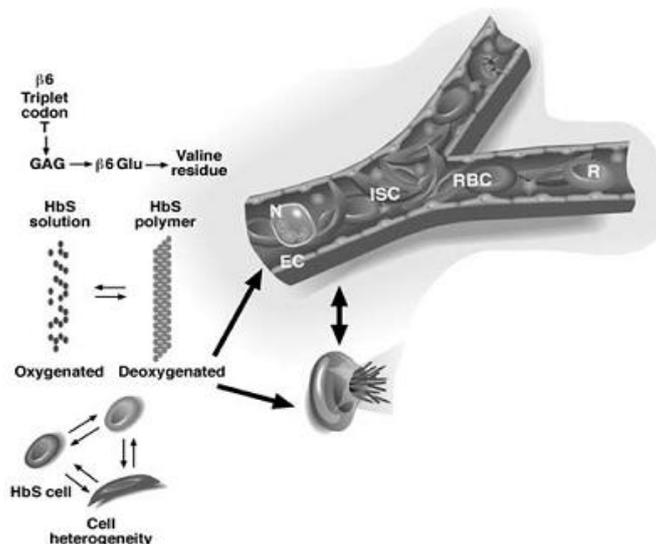
**Anexo 6 – Transição do estado T para o R na hemoglobina. Na oxigenação, um par de subunidades  $\alpha\beta$  desvia-se para outra pela rotação de 15 graus (Berg et al., n.d.).**



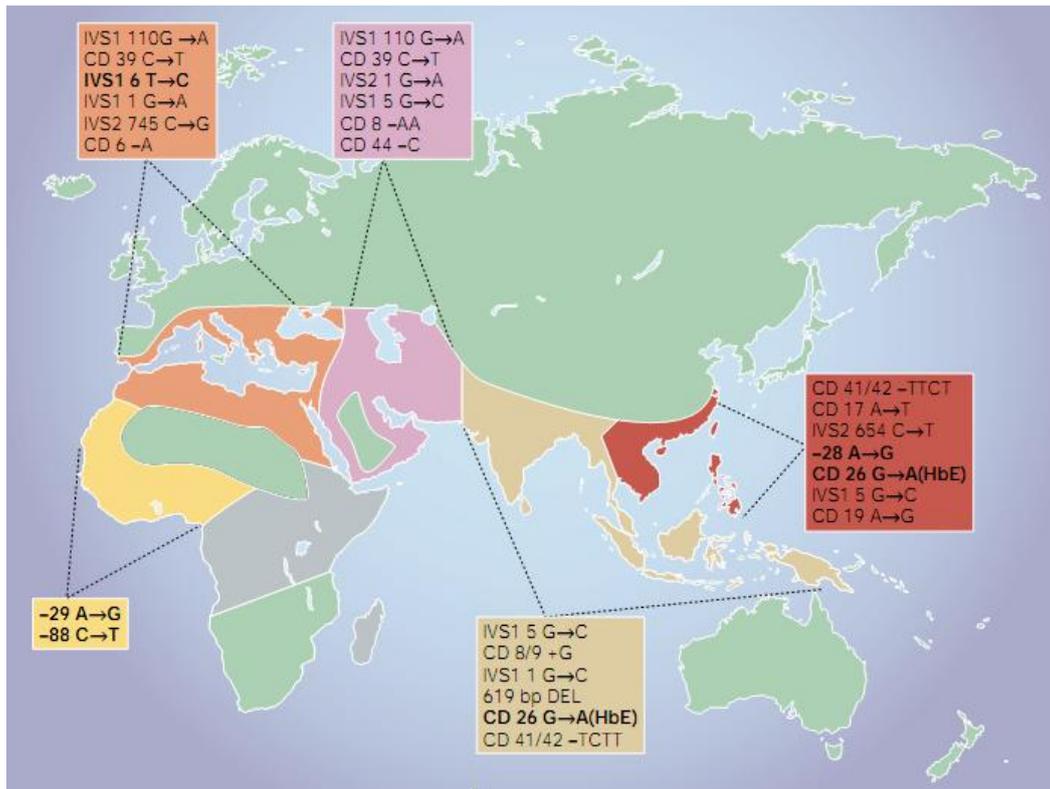
**Anexo 7 – Distribuição global das hemoglobinopatias, em termos de nascimentos de crianças afectadas por 1000 nascimentos (OMS).**



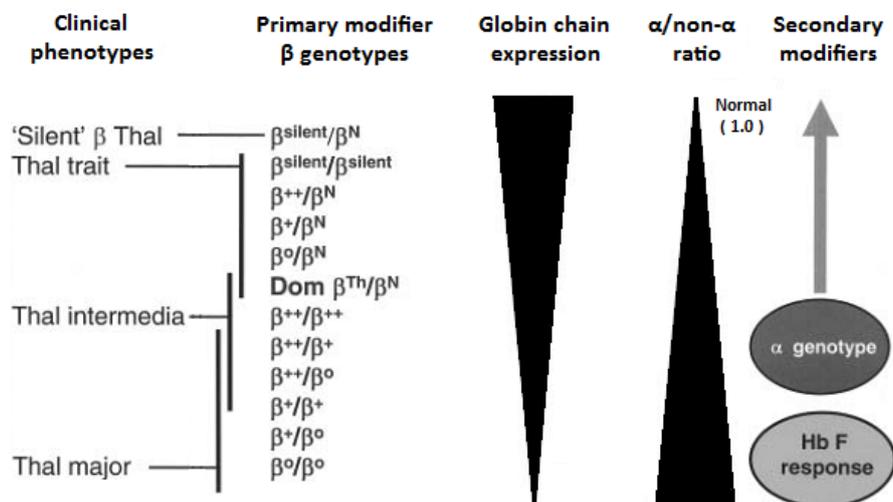
Anexo 8 – Sinopse do rastreo de portadores para diferentes tipos de hemoglobinopatias. O rastreo primário é baseado principalmente nos índices de eritrócitos e quantificação de Hb. Contagens reduzidas de glóbulos vermelhos, HGM<28 pg e VGM<81 fL são indicadores percíveis de uma desordem talassêmica, enquanto que são requeridos estudos adicionais para caracterizar uma variante estrutural de Hb (Patrinos et al., 2005).



Anexo 9 – Patofisiologia da doença de células falciformes. A substituição do nucleótido na Hb S leva à troca de um resíduo de ácido glutâmico por um de valina. Na desoxigenação, forma-se um polímero Hb S, causando células falciformes e danos na membrana do eritrócito. Algumas células são destruídas na circulação, libertando Hb e arginase e esgotando o óxido nítrico biodisponível (Martín H. Steinberg et al., 2009).



Anexo 10 – Distribuição global de mutações que dão origem a talassémias  $\beta$ . As mutações mais comuns estão representadas a negrito (D J Weatherall, 2001).



Anexo 11 – Modificadores primários e secundários do fenótipo de talassémia  $\beta$ . Eles incluem a produção variada de cadeias  $\beta$  (genótipo), de cadeias  $\alpha$  (genótipo  $\alpha$ ) e resposta variável do Hb F. As consequências destes factores são a produção inefectiva de cadeias globínicas, o grau de desequilíbrio das cadeias (rácio  $\alpha$ /non- $\alpha$ ) (Swee Lay Thein, 2005)(Patrinos et al., 2005).

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abdulmalik, O., Safo, M. K., Lerner, N. B., Ochotorena, J., Daikhin, E., Lakka, V., Santacroce, R., et al. (2004). Characterization of Hemoglobin Bassett (alpha94Asp->Ala), a variant with very low oxygen affinity. *American journal of hematology*, 77, 268-276. doi:10.1002/ajh.20184

Adachi, K., Ding, M., Wehrli, S., Reddy, K. S., Surrey, S., & Horiuchi, K. (2003). Effects of different beta73 amino acids on formation of 14-stranded fibers of Hb S versus double-stranded crystals of Hb C-Harlem. *Biochemistry*, 42(15), 4476-84. doi:10.1021/bi026740x

Adachia, K., Vonk, H., Reilly, M. P., Adachia, H., Schroeder, W. A., Schwartz, E., & Asakura, T. (1984). Relationship between tetramer-dimer assembly and the stability of Hb Malmö ( $\alpha 2\beta 297\text{Gln}$ ). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 790(2), 132-140.

Aguilar-Martinez, P., Badens, C., Bonello-Palot, N., Cadet, E., Couque, N., Ducrocq, R., Elion, J., et al. (2010). Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinopathies Flowcharts for the diagnosis and the molecular characterization of hemoglobinopathies. *Ann Biol Clin*, 68(4), 455-464.

Akinsheye, I., Al-Sultan, A., Solovieff, N., Ngo, D., Baldwin, C. T., Sebastiani, P., Chui, D. H. K., et al. (2011). Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood*, 118(1), 19-27. doi:10.1182/blood-2011-03-325258

Alanazi, M., Abduljaleel, Z., Khan, W., Warsy, A. S., Elrobh, M., Khan, Z., Amri, A. A., et al. (2011). In Silico Analysis of Single Nucleotide Polymorphism ( SNPs ) in Human beta -Globin Gene. *PLoS ONE*, 6(10). doi:10.1371/journal.pone.0025876

Anderson, N. L. (1974). Hemoglobin San Diego (b109(G11) Val->Met). *The Journal of clinical investigation*, 53, 329-333.

Anderson, N. L. (1976). Hemoglobin St. Louis (beta28 (B10) Leu->Gln). *The Journal of clinical investigation*, 58, 1107-1109.

Badens, C., Paolosso, C., Fossat, C., Wajcman, H., & Thuret, I. (2005). Compound heterozygosity for Unstable Haemoglobin Genova and  $\beta 0$ -thalassaemia associated with early onset of Thalassaemia Major syndrome. *Hematologica*, 90(1), e7-e8.

Baglioni, C., & Ventruto, V. (1968). Human Abnormal Hemoglobins. *European J. Biochem.*, 5, 29-32.

Baird, M., Schreiner, H., Driscoll, C., & Bank, A. (1981). Localization of the site of recombination in formation of the Lepore Boston globin gene. *The Journal of clinical investigation*, 68(2), 560-564. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=370832&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Bardakdjian, J., Kister, J., Rhoda, M., Marden, M., Arous, N., Leon, J. D., North, M., et al. (1988). Hb J-Cordoba [ $\alpha$ 2A  $\beta$ 2(95)(FG2) Lys $\rightarrow$ Met ]. A new Hb variant found in Argentina. *Hemoglobin*, *12*(1), 1-11.

Beauvais, P. (2000). Les méthémoglobinémies héréditaires. *Arch Pédiatric*, *7*, 513-518.

Bento, C., Relvas, L., Vazão, H., Campos, J., Rebelo, U., & Ribeiro, M. L. (2006). The use of capillary blood samples in a large scale screening approach for the detection of beta-thalassemia and hemoglobin variants. *Haematologica*, *91*(11), 1567.

Bento, M., Ribeiro, M., Cunha, E., Rebelo, U., Granjo, E., Granado, C., & Tamagnini, G. (2000). Hb Vila Real [ $\beta$ 36(C2)Pro $\rightarrow$ His]: a newly discovered high oxygen affinity variant. *Hemoglobin*, *24*(1), 59-63.

Benz, E. J., Berman, B. W., Tonkonow, B. L., Coupal, E., Coates, T., Boxer, L. A., Altman, A., et al. (1981). Molecular Analysis of the Beta-Thalassemia Phenotype Associated with Inheritance of. *J. Clin. Invest.*, *68*, 118-126.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (n.d.). *Biochemistry*.

Bird, G. W. G. (1972). The Haemoglobinopathies. *British Medical Journal*, *1*, 363-368.

Bisse, E., Schaubert, C., Zorn, N., Epting, T., Eigel, A., Dorsselaer, A. V., Wieland, H., et al. (2003). Hemoglobin Gorwihl [ $\alpha$ 2 $\beta$ 2 5(A2) Pro $\rightarrow$ Ala], an Electrophoretically Silent Variant with Impaired Glycation. *Clinical chemistry*, *49*(1), 137-143.

Bonaventura, J., Bonaventura, C., Amiconi, G., Antonini, E., & Maurizio Brunori. (1974). Functional properties of hemoglobin leiden ( $\alpha$ 2A $\beta$ 26 or7 Glu deleted). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *161*(1), 328-332.

Boncimino, A., Bertaina, A., & Locatelli, F. (2010). Cord blood transplantation in patients with hemoglobinopathies. *Transfusion and Apheresis Science*, *42*, 277-281. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.transci.2010.03.006

Bonini-domingos, C. R., Silveira, E. L. V. da, Viana-baracioli, L. M. S., & Canali, A. A. (2003). Caracterização de hemoglobina N-Baltimore em doador de sangue de São José do Rio Preto , SP. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, *39*(1), 41-44.

Bookchin, R. M., Nagel, R. L., & Ranney, H. M. (1967). Structure and properties of hemoglobin C-Harlem, a human hemoglobin variant with amino acid substitutions in 2 residues of the beta-polypeptide chain. *The Journal of biological chemistry*, *242*(2), 248-55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6016610>

Bouid, K., Odièvre, M.-H., Ithier, G., Benkerrou, M., Couque, N., Elion, J., & Ducrocq, R. (2011). Syndromes drépanocytaires atypiques : à propos de deux cas. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, *26*(5-6), 267-275. Elsevier Masson SAS. doi:10.1016/j.immbio.2011.10.003

Brabec, V., Indrák, K., Fortová, H., Suttnar, J., Blazek, B., Cermák, J., Divoký, V., et al. (1994). Hb Nottingham or  $\alpha 2\beta 2$  98 (FG5) Val- Gly in a Czech child. *Ann Hematol*, 69, 93-95.

Breda, L., Gambari, R., & Rivella, S. (2009). Gene therapy in thalassemia and hemoglobinopathies. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 1(1). doi:10.4084/MJHID.2009.008

Bry, L., Chen, P. C., & Sacks, D. B. (2001). Effects of Hemoglobin Variants and Chemically Modified Derivatives on Assays for Glycohemoglobin. *Clinical Chemistry*, 47(2), 153-163.

Bunn, H. (1981). Evolution of mammalian hemoglobin function. *Blood Journal*, 58(2), 189-197.

Cabeda, J. M., Correia, C., Estevinho, A., Simões, C., Amorim, M. L., Pinho, L., & Justiça, B. (1999). Unexpected pattern of beta-globin mutations in beta-thalassaemia patients from northern Portugal. *British Journal of Haematology*, 105, 68-74.

Calvo-Villas, J. M., Ramos, M. F. Z., Tovar, J. C., Íñigo, S. D. L. I., Gradilla, P. R., Granda, E. C. D., & Guillén, F. S. (2006). Prevalencia de hemoglobinopatías en mujeres gestantes en el área sanitaria de Lanzarote. *Anales Medicina Interna*, 23(5), 206-212.

Campbell, M. K., & Farrell, S. O. (2006). *Biochemistry* (Fifth.). Thomson Brooks/Cole.

Cao, A., Moi, P., & Galanello, R. (2011). Recent advances in  $\beta$ -thalassemias. *Pediatric reports*, 3(2), 65-78. doi:10.4081/pr.2011.e17

Ceccarelli, M., Ruggerone, P., Anedda, R., Fais, A., Era, B., Sollaino, M. C., Corda, M., et al. (2006). Structure-Function Relationship in a Variant Hemoglobin: A Combined Computational-Experimental Approach. *Biophysical journal*, 91, 3529-3541. doi:10.1529/biophysj.106.083170

Chernoff, A. I. (1958). The hemoglobin D syndromes. *Blood*, 13(2), 116-127. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13510290>

Chihchuan, L., Hainan, T., Hweiyuen, L., Shangzhi, H., Ruiyou, L., & Bauseng, W. (1981). Hemoglobin Shuangfeng ( $\alpha 27$  (B8) Glu substituting for Lys): a new unstable hemoglobin variant. *Hemoglobin*, 5(7-8), 691-700.

Christopoulou, G., Tserga, A., Patrinos, G. P., & Papadakis, M. N. (2004). Molecular Characterization and Diagnosis of Hb Crete [ $\beta 129$ (H7)Ala $\rightarrow$ Pro]. *Hemoglobin*, 28(4), 339-342. doi:10.1081/HEM-200037796

Clarke, G. M., & Higgins, T. N. (2000). Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clinical chemistry*, 46(8), 1284-1290. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10926923>

Cohen, A. R., Galanello, R., Pennell, D. J., Cunningham, M. J., & Vichinsky, E. (2004). Thalassemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of*

*Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 14-34. doi:10.1182/asheducation-2004.1.14

Cohen-Solal, M., Seligmann, M., Thillet, J., & Rosa, J. (1973). HAEMOGLOBIN SAINT LOUIS Beta28 (B1 0) LEUCINE -> GLUTAMINE A new unstable haemoglobin only present in a ferri form. *FEBS letters*, 33(1), 37-41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4722493>

Colah, R. B., Surve, R., Sawant, P., Souza, E. D., Italia, K., Phanasgaonkar, S., Nadkarni, A. H., et al. (2007). HPLC Studies in Hemoglobinopathies. *J Pediatr*, 74(7), 657-662.

Das, S. K., & Talukder, G. (2002). Beta Globin Gene and Related Diseases : A Review. *Int J Hum Genet*, 2(3), 139-152.

Dean, A. (2006). On a chromosome far, far away: LCRs and gene expression. *Trends in genetics : TIG*, 22(1), 38-45. doi:10.1016/j.tig.2005.11.001

Deutsch, S., Darbellay, R., Offord, R., Frutiger, a, Kister, J., Wajcman, H., & Beris, P. (1999). Hb Iraq-Halabja beta10 (A7) Ala-->Val (GCC-->GTC): a new beta-chain silent variant in a family with multiple Hb disorders. *American journal of hematology*, 61(3), 187-93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10398311>

Eisinger, J., Flores, J., Tyson, J. a, & Shohet, S. B. (1985). Fluorescent cytoplasm and Heinz bodies of hemoglobin Köln erythrocytes: evidence for intracellular heme catabolism. *Blood*, 65(4), 886-93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3978233>

Emery, D. W., Yannaki, E., Tubb, J., Nishino, T., Li, Q., & Stamatoyannopoulos, G. (2002). Development of virus vectors for gene therapy of beta chain hemoglobinopathies: flanking with a chromatin insulator reduces gamma-globin gene silencing in vivo. *Blood*, 100(6), 2012-2019. doi:10.1182/blood-2002-01-0219

Fabry, M. E., Sengupta, a, Suzuka, S. M., Costantini, F., Rubin, E. M., Hofrichter, J., Christoph, G., et al. (1995). A second generation transgenic mouse model expressing both hemoglobin S (HbS) and HbS-Antilles results in increased phenotypic severity. *Blood*, 86(6), 2419-28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7662990>

Fairhurst, R. M., & Casella, J. F. (2004). Homozygous hemoglobin C disease. *The New England Journal of Medicine*, 350(26). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22033449>

Fang, J.-P., & Xu, L.-H. (2010). Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Children With Thalassemia Major in China. *Pediatric Blood and Cancer*, 55, 1062-1065. doi:10.1002/pbc

Faustino, P., Osrio-almeida, L., Barbot, J., Espírito-santo, D., Gonçalves, J., Romão, L., Martins, M. C., et al. (1992). Novel promoter and splice junction defects add to the genetic , clinical or geographic heterogeneity of beta-thalassaemia in the Portuguese population. *Hum Genet*, 89, 573-576.

Faustino, P., Pacheco, P., Loureiro, P., Nogueira, P. J., & Lavinha, J. (1999). THE GEOGRAPHIC PATTERN OF BETA-THALASSAEMIA MUTATIONS IN THE PORTUGUESE POPULATION. *British Journal of Haematology*, 107, 903-904.

Gacon, G, Krishnamoorthy, R., Wajcman, H., Labie, D., Tapon, J., & Cosson, A. (1977). Hemoglobin Djelfa beta98 (FG 5) Val lead to Ala: isolation and functional proterties of the heme saturated form. *Biochim Biophys Acta*, 25(1), 156-163.

Gacon, Gcrard, Wajcman, H., & Cosson, A. (1975). A NEW UNSTABLE HEMOGLOBIN MUTATED IN b 98 (FG 5) Val -> Ala: Hb Djelfa. *Febs Letters*, 58(1), 1-3.

Galacteros, F., Loukopoulos, D., Fessas, P., Kister, J., Bohn, B., Loutradi, A., Tsitrakis, G., et al. (1989). Hemoglobin Koln occuring in association with a beta zero thalassemia: hematologic and functional consequences. *Blood*, 74(1), 496-500.

Galanello, R., & Cao, A. (n.d.). Relationship between genotype and phenotype. Thalassemia intermedia. *Annals New York Academic of Sciences*, 325-333.

Galanello, R., & Origa, R. (2010). Beta-thalassemia. *Orphanet journal of rare diseases*, 5(11), 1-15. doi:10.1186/1750-1172-5-11

George Priya Doss, C., & Rao, S. (2009). Impact of single nucleotide polymorphisms in HBB gene causing haemoglobinopathies: in silico analysis. *New biotechnology*, 25(4), 214-219. doi:10.1016/j.nbt.2009.01.004

Geva, A., Clark, J. J., Zhang, Y., Popowicz, A., Manning, J. M., & Neufeld, E. J. (2004). Hemoglobin Jamaica Plain — A Sickling Hemoglobin with Reduced Oxygen Affinity. *The New England Journal of Medicine*, 351(1), 1532-1538.

Giambona, A., Passarello, C., Renda, D., & Maggio, A. (2009). The significance of the hemoglobin A(2) value in screening for hemoglobinopathies. *Clinical biochemistry*, 42, 1786-1796. The Canadian Society of Clinical Chemists. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.06.026

Gihan Adly, A. R. (2008). Haemoglobinopathies encountered at Khoula Hospital, Oman. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 8(1), 59-62.

Giménez, O. G., Torrealba, M. C., Urquiola, M. B., Ortiz, G. G., Fonseca, S. M., Merzón, R., Donato, M. de, et al. (2009). Diagnóstico de hemoglobinopatías a partir de sangre del talón nacidos en diferentes centros hospitalarios de Venezuela de recién nacidos en diferentes centros hospitalarios de Venezuela. *Anales de Pediatría*, 71(4), 314-318. doi:10.1016/j.anpedi.2009.07.005

Giordano, P. C., Harteveld, C. L., Brand, A., Willems, L. N. A., Kluin-Nelemans, H. C., Plug, R. J., Batelaan, D. N., et al. (1996). Hb Malmö [beta97 (FG-4) His->Gln] leading to polycythemia in a Dutch family. *Ann Hematol*, 73, 183-188.

Goossens, M., Garel, M. C., Auvinet, J., Basset, P., Ferreira Gomes, P., Rosa, J., & Arous, N. (1975). Hemoglobin C Ziguichor alpha2A beta2 6 (A3) Glu -> Val beta58

(E2) Pro → Arg: the second sickling variant with amino acid substitutions in 2 residues of the beta polypeptide chain. *Febs Letters*, 58(1), 149-154.

Gordon-Smith, E. C., Dacie, J. V., Blecher, T. E., French, E. A., Wiltshire, B. G., & Lehmann, H. (1973). Haemoglobin Nottingham, betaFG 5(98) Val→Gly: A new unstable haemoglobin producing severe haemolysis. *Proc. roy. Soc. Med.*, 66, 507-508.

Hardison, R. C., Chui, D. H. K., Giardine, B., Riemer, C., Patrinos, G. P., Anagnou, N., Miller, W., et al. (2002). HbVar: A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Human mutation*, 19(3), 225-233. doi:10.1002/humu.10044

Hartwell, S. K., Srisawang, B., Kongtawelert, P., Christian, G. D., & Grudpan, K. (2005). Review on screening and analysis techniques for hemoglobin variants and thalassemia. *Talanta*, 65, 1149-1161. doi:10.1016/j.talanta.2004.09.013

Harvey, M., Giupponi, G., & Fabritiis, G. D. (2009). ACEMD: Accelerated molecular dynamics simulations in the microseconds timescale. *J. Chem. Theory and Comput.*, 5, 1632.

Heller, P. (1965). Analytical Review: The Molecular Basis of the Pathogenicity of Abnormal Hemoglobins—Some Recent Developments. *Blood Journal*, 25(1), 110-125.

Henry, E., Levitt, M., & Eaton, W. (1985). Molecular dynamics simulation of photodissociation of carbon monoxide from hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82, 2034–2038.

Hill, K. A., Gonzalez, K. D., Scaringe, W. A., Wang, J.-cheng, & Sommer, S. S. (2006). Preferential Occurrence of 1 – 2 Microindels. *Human mutation*, 27(1), 55-61. doi:10.1002/humu

Hirano, M., Ohba, Y., Imai, K., Ino, T., Morishita, Y., Matsui, T., Shimizu, S., et al. (1981). Hb Toyoake: beta142 (H20) Ala→Pro. A new unstable hemoglobin with high oxygen affinity. *Blood*, 57(4), 697-704.

Horst, J., Oehme, R., Kleihauer, E., & Kohne, E. (1984). Hemoglobin Koln: Analysis of Linkage Relationships between the Mutant Gene and Polymorphic Restriction Sites in the Beta-Globin Gene Cluster. *Blut*, 48, 213-219.

Horst, J., Oehme, R., & Kohne, E. (1986). Hemoglobin Koln: direct analysis of gene mutation by synthetic DNA probes. *Blood*, 68(5), 1175-1177.

Hoyer, J. D., McCormick, D. J., Snow, K., Kubik, K. S., Holmes, M. W., Dawson, D. B., Shaber, R., et al. (2002). Four new beta chain hemoglobin variants without clinical or hamtological effects: Hb San Bruno [b39 (C5) Gln→His]; Hb Fort Dodge [b93 (F9) Cys→Tyr]; Hb Rhode Island [b116 (G18) His→Tyr]; and Hb Inglewood [b142(H20) Ala→Thr]. *Hemoglobin*, 26(3), 299-303.

Hoyer, J. D., Wendt, P. C., Hogan, W. J., & Oliveira, J. L. (2011). Hb Nebraska [β86(F2)Ala→Ile (HBB:c.259G>A;260C>T)]: a unique high oxygen affinity

hemoglobin variant with a double nucleotide substitution within the same codon. *Hemoglobin*, 35(1), 22-7. doi:10.3109/03630269.2011.552380

Jacob, H. S., & Winterhalter, K. H. (1970). The Role of Hemoglobin Heme Loss in Heinz Body Formation : Studies with a Partially Heme-Deficient Hemoglobin and with Genetically Unstable Hemoglobins. *The Journal of clinical investigation*, 49, 2008-2016.

Jeremiah, Z. A. (2006). Abnormal haemoglobin variants, ABO and Rh blood groups among student of African descent in Port Harcourt, Nigeria. *African health sciences*, 6(3), 177-181. doi:10.5555/afhs.2006.6.3.177

Joly, P., Garcia, C., Lacan, P., Couprie, N., & Francina, A. (2011). Two new hemoglobin variants: Hb Aix-les-Bains [ $\beta 5(A2)Pro \rightarrow Leu$ ; HBB:c.17 C>T] and Hb Dubai [ $\alpha 122(H5)His \rightarrow Leu$  ( $\alpha 2$ ); HBA2:c.368 A>T]. *Hemoglobin*, 35(2), 147-151. doi:10.3109/03630269.2010.550795

Jorge, S. E. D. C., Petruk, A. a, Kimura, E. M., Oliveira, D. M., Caire, L., Suemasu, C. N., Silveira, P. a a, et al. (2012). Hb S-São Paulo: a new sickling hemoglobin with stable polymers and decreased oxygen affinity. *Archives of biochemistry and biophysics*, 519(1), 23-31. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.abb.2012.01.001

Jorgensen, W., Chandrasekhar, J., Madura, J., Impey, R., & Klein, M. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys*, 79, 926.

Kendall, A. G., Ojwang, P. J., Schroeder, W. A., & Huisman, T. H. J. (1973). Hemoglobin Kenya, the product of gamma-beta fusion gene: studies of the family. *Am J Hum Genet*, 25, 548-563.

Khelil, A. H., Denden, S., Leban, N., Daimi, H., Lakhdhar, R., Lefranc, G., Chibani, J. B., et al. (2010). HEMOGLOBINOPATHIES IN NORTH AFRICA : A REVIEW. *Hemoglobin*, 34(1), 1-23. doi:10.3109/03630260903571286

Kifude, C. M., Polhemus, M. E., Heppner, D. G., Withers, M. R., Ogutu, B. R., & Waitumbi, J. N. (2007). Hb Kenya among Luo adults and young children in malaria holoendemic Western Kenya: screened by high performance liquid chromatography and confirmed by polymerase chain reaction. *Hemoglobin*, 31(4), 401-8. doi:10.1080/03630260701587638

Kohne, E. (2011). Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Deutsches Ärzteblatt international*, 108(31-32), 532-540. doi:10.3238/arztebl.2011.0532

Kohne, E., & Kleihauer, E. (2010). Hemoglobinopathies: a longitudinal study over four decades. *Deutsches Ärzteblatt international*, 107(5), 65-71. doi:10.3238/arztebl.2010.0065

Kutlar, F., Hilliard, L. M., Zhuang, L., Patel, N., Eroglu, B., Meiler, S. E., Carmichael, H., et al. (2009). Hb M Dothan [ $\beta 25/26$  (B7/B8)/(GGT/GAG-->GAG//Gly/Glu--

>Glu]; a new mechanism of unstable methemoglobin variant and molecular characteristics. *Blood cells, molecules & diseases*, 43(3), 235-238. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.bcmed.2009.08.006

Leach, K. M., Nightingale, K., Igarashi, K., Levings, P. P., Engel, J. D., Becker, P. B., & Bungert, J. (2001). Reconstitution of Human Beta-Globin Locus Control Region Hypersensitive Sites in the Absence of Chromatin Assembly. *Molecular and Cellular Biology*, 21(8), 2629-2640. doi:10.1128/MCB.21.8.2629

Li, Q., Peterson, K. R., Fang, X., & Stamatoyannopoulos, G. (2002). Locus control regions. *Trends Genet.*, 15(10), 403-408. doi:10.1182/blood-2002-04-1104

Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., & Klepeis, J. (2010). Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins*, 78, 1950–1958.

Lionnet, F., Hammoudi, N., Stankovic Stojanovic, K., Avellino, V., Grateau, G., Girot, R., & Haymann, J.-P. (2011). Hemoglobin SC disease complications: a clinical study of 179 cases. *Haematologica*. doi:10.3324/haematol.2011.055202

Little, R. R., & Roberts, W. L. (2009). A Review of Variant Hemoglobins Interfering with Hemoglobin A1c Measurement. *Journal of diabetes science and technology*, 3(3), 446-451. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2769887&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Lojo, L., Santiago-Borrero, P., Rivera, E., Renta, J., & Cadilla, C. L. (2011). Asymptomatic Child Heterozygous for Hemoglobin S and Hemoglobin Pôrto Alegre. *Pediatric Blood Cancer*, 56, 458-459. doi:10.1002/pbc

Lorkin, P. A. (1973). Fetal and embryonic haemoglobins. *Journal of medical genetics*, 10, 50-64. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1012975&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Manca, L., & Masala, B. (2008). Disorders of the Synthesis of Human Fetal Hemoglobin. *Life*, 60(2), 94-111. doi:10.1002/iub.4

Manconi, B., De Rosa, M. C., Cappabianca, M. P., Olianias, A., Carelli Alinovi, C., Mastropietro, F., Ponzini, D., et al. (2010). A new beta-chain haemoglobin variant with increased oxygen affinity: Hb Roma [beta115(g17)Ala-->Val]. *Biochimica et biophysica acta*, 1800(3), 327-335. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.bbagen.2009.10.010

Marengo-Rowe, A. J. (2006). Structure-function relations of human hemoglobins. *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*, 19(3), 239-245. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1484532&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Masala, B., & Manca, L. (1992). *Biochimica delle emoglobine umane mutate* (p. 125). Piccin-Nuova Libreria.

May, A., & Huehns, E. R. (1972). The Control of Oxygen Affinity of Red Cells with Hb-Shepherds Bush. *British Journal of Haematology*, 22(5), 599-607. doi:10.1111/j.1365-2141.1972.tb05706.x

Miranda, S. R. P., Fonseca, S. F., & Figueiredo, M. S. (1997). Hb Köln [ $\alpha^2\beta^2$  98 (FG5) val-met ] identified by DNA analysis in a Brazilian family. *Brazilian Journal of Genetics*, 20(4), 2-5.

Modell, B., Darlison, M., Birgens, H., Cario, H., Faustino, P., Giordano, P. C., Gulbis, B., et al. (2007). Epidemiology of haemoglobin disorders in Europe: an overview. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 67(1), 39-69. doi:10.1080/00365510601046557

Modell, Bernadette, & Darlison, M. (2008). Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bulletin of the World Health Organization*, 86(6), 480-487. doi:10.2471/BLT.06.036673

Moo-Penn, W. F., Schneider, R. G., Shih, T.-bi, Jones, R. T., Govindarajan, S., Govindarajan, P. G., & Patchen, L. C. (1980). Hemoglobin Ohio (b142 Ala->Asp): a new abnormal hemoglobin with high oxygen affinity and erythrocytosis. *Blood*, 56(2), 246-250.

Moo-Penn, W., Schneider, R., Andrian, S., & Das, D. (1978). Hemoglobin Detroit : beta95 (FG2) lysine leads to asparagine. *Biochim Biophys Acta*, 536(1), 283-288.

Moo-penn, W. F., Schmidt, R. M., Jue, D. L., Bechtel, K. C., Wright, J. M., Horne III, M. K., Haycraft, G. L., et al. (1977). Hemoglobin S Travis : a sickling hemoglobin with two amino acid substitutions [ $\beta^6$ (A3)Glutamic acid -> Valine and  $\beta^142$ (H20) Alanine -> Valine. *Eur J Biochem*, 77, 561-566.

Moradkhani, K., Préhu, C., Old, J., Henderson, S., Balamitsa, V., Luo, H.-Y., Poon, M.-C., et al. (2009). Mutations in the paralogous human alpha-globin genes yielding identical hemoglobin variants. *Annals of hematology*, 88, 535-543. doi:10.1007/s00277-008-0624-3

Muncie, H. L., & Campbell, J. S. (2009). Alpha and Beta Thalassemia. *Am Fam Physician*, 80(4), 339-344.

Nagababu, E., Fabry, M. E., Nagel, R. L., & Rifkind, J. M. (2008). Heme degradation and oxidative stress in murine models for hemoglobinopathies: thalassemia, sickle cell disease and hemoglobin C disease. *Blood cells, molecules & diseases*, 41(1), 60-66.

Nagel, R. L., Daar, S., Romero, J. R., Suzuka, S. M., Gravell, D., Bouhassira, E., Schwartz, R. S., et al. (1998). HbS-oman heterozygote: a new dominant sickle syndrome. *Blood*, 92(11), 4375-82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9834244>

Nagela, R. L., Riedera, R. F., Bookchina, R. M., & G. Watson James III. (1973). Some functional properties of hemoglobin Leiden. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 53(4), 1240-1245.

- Nute, E., Stamatoyannopoulos, G., Hermodson, M. A., & Roth, D. (1974). Hemoglobinopathic Erythrocytosis due to new electrophoretically silent variant, hemoglobin San Diego (b109(G11)Val->Met). *The Journal of clinical investigation*, 53, 320-328.
- Ohba, Y., Imai, K., Kumada, I., Ohsawa, A., & Miyaji, T. (1989). Hb Moriguchi or alpha 2 beta 2 (97) (FG4) His---Tyr substitution at the alpha 1-beta 2 interface. *Hemoglobin*, 13(4), 367-376.
- Ohba, Y., Imanaka, M., Matsuoka, M., Hattori, Y., Miyaji, T., Funaki, C., Shibata, K., et al. (1985). A new unstable, high oxygen affinity hemoglobin: Hb Nagoya or beta 97 (FG4) His----Pro. *Hemoglobin*, 9(1), 11-24.
- Okoli, K., Irani, F., & Horvath, W. (2009). Pathophysiologic considerations for the interactions between obstructive sleep apnea and sickle hemoglobinopathies. *Medical hypotheses*, 72(5), 578-580. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.mehy.2008.12.012
- Old, J. M. (2003). Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood Reviews*, 17, 43-53. doi:10.1016/S0268-960X(02)00061-9
- Olivieri, N. F., Pakbaz, Z., & Vichinsky, E. (2011). Hb E / beta-thalassaemia : a common & clinically diverse disorder. *Indian J Med Res*, (October), 522-531.
- Ostertag, W., & Smith, E. W. (1969). Hemoglobin-Lepore Baltimore, atHird Type of a deltabeta crossover (delta50, beta86). *European J. Biochem.*, 10, 371-376.
- Patrinos, G. P., Kollia, P., & Papadakis, M. N. (2005). Molecular Diagnosis of Inherited Disorders : Lessons From Hemoglobinopathies. *Human Mutation*, 26(5), 399-412. doi:10.1002/humu.20225
- Pedersen, P. R., McCurdy, P. R., Wrightstone, R. N., Wilson, J. B., Smith, L. L., & Huisman, T. H. (1973). Hemoglobin Köln in a black: pre- and post-splenectomy red cell survival (DF32P and 51Cr) and the pathogenesis of hemoglobin instability. *Blood*, 42(5), 771-781. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4746101>
- Perlman, M. M., Wiltshire, B. G., Stevens, K., Cassel, R., & Lehmann, H. (1981). Haemoglobin Leiden In a South African Negro. *S. Afr. med. J.*, 59, 537-540.
- Petrides, P. E., Beykirch, M. K., & Kohne, E. (2008). The high oxygen-affinity Hemoglobin Johnstown [(beta 109(G11) Val-->Leu] in a German kindred with an elevated erythrocyte hemoglobin content: potential interaction with HFE mutations. *Blood cells, molecules & diseases*, 40(2), 180-2. doi:10.1016/j.bcmed.2007.08.007
- Plaseska, D., Dimovski, A. J., Wilson, J. B., Webber, B. B., Hume, H. A., & Huisman, T. H. J. (1991). Hemoglobin Montreal: a new variant with an extended beta chain due to a deletion of Asp, Gly, Leu at positions 73, 74, and 75, and an insertion of Ala, Arg, Cys, Gln at the same location. *The American Society of Hematology*, 77(1), 178-181.
- Podda, a, Galanello, R., Maccioni, L., Melis, M. a, Rosatelli, C., Perseu, L., & Cao, A. (1991). Hemoglobin Cagliari (beta 60 [E4] Val---Glu): a novel unstable thalassaemic

hemoglobinopathy. *Blood*, 77(2), 371-375. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1985702>

Provan, D., & Gribben, J. (2010). *Molecular Hematology*. (D. Provan & J. Gribben, Eds.) (Third Edit.). Wiley-Blackwell.

R. G. H. Cotton. (1996). Update on Nomenclature for Human Gene Mutations. *Human mutation*, 8, 197-202.

Rai, D. K., Alvelius, G., & Landin, B. (2002). Identification of Hb Kenya (Agamma81Leu-p86Ala ) by electrospray mass spectrometry. *Hemoglobin*, 26(1), 71-75.

Ribeiro, M. L., Cunha, E., Gonçalves, P., Núñez, G. M., Galan, M. A. F., Tamagnini, G. P., Smetanina, N. S., et al. (1997). Hb Lepore-Baltimore ( $\delta 68\text{Leu}-\beta 84\text{Thr}$ ) and Hb Lepore-Washington-Boston ( $\delta 87\text{Gln}-\beta\text{IVS-II-8}$ ) in Central Portugal and Spanish Alta Extremadura. *Hum Genet*, 99, 669-673.

Rieder, R. F., & James, G. 3d. (1976). Translation of human globin mRNA: globin synthesis in cells containing Hb Leiden. *Blood*, 47(3), 489-494.

Roche, C. J., Malashkevich, V., Balazs, T. C., Dantsker, D., Chen, Q., Moreira, J., Almo, S. C., et al. (2011). Structural and functional studies indicating altered redox properties of hemoglobin E: implications for production of bioactive nitric oxide. *The Journal of biological chemistry*, 286(26), 23452-66. doi:10.1074/jbc.M110.183186

Romana, M., Gerard, N., Chout, R., Krishnamoorthy, R., & Marianne-Penin, T. (2002). Origin of Hb S Antilles. *American Journal of Hematology*, 70, 331-332. doi:10.1002/ajh.10127

Ropero, P., Villegas, a, González, a F., Anguita, E., Sánchez, J., Carreño, D. L., Arrizabalaga, B., et al. (2000). Hb Johnstown [ $\beta 109(\text{G11})\text{Val}\rightarrow\text{Leu}$ ]: second case described and associated for the first time with  $\beta(0)$ -thalassemia in two Spanish families. *American journal of hematology*, 65(4), 298-301. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11074558>

Rosa, M. C. D., Carelli Alinovi, C., Sshininà, M. E., Clementi, M. E., Mato, A., Cappabianca, M. P., Pezzotti, M., et al. (2007). Hb Santa Clara ( $\beta 97\text{His}\rightarrow\text{Asn}$ ), a human haemoglobin variant: Functional characterization and structure modelling. *Biochim Biophys Acta*, 1774, 1299-1306. doi:10.1016/j.bbapap.2007.08.004

Ruvidic, R., Efremov, G., Juricic, D., Rolovic, Z., Ruzdic, I., & Pendic, S. (1975). Hemoglobin Beograd ( $\alpha 2\beta 2$  121 Glu leads to Val) interacting with  $\beta$ -thalassemia. *Acta Haematol*, 54(3), 180-187.

Saechan, V., Nopparatana, C., Nopparatana, C., & Fucharoen, S. (2010). Molecular basis and hematological features of hemoglobin variants in Southern Thailand. *International journal of hematology*, 92(3), 445-50. doi:10.1007/s12185-010-0682-x

Salzano, A. M., Carbone, V., Pagano, L., Buffardi, S., Rosa, C. D., & Pucci, P. (2002). Hb VILA REAL [ $\beta$ 36 (C2) Pro - > His ] IN ITALY : CHARACTERIZATION OF THE AMINO ACID SUBSTITUTION AND THE DNA MUTATION. *Hemoglobin*, 26(1), 21-31.

Sanguansermisri, P., Shimbhu, D., Wongvilairat, R., Pimsorn, C., & Sanguansermisri, T. (2003). Spontaneous mutation of hemoglobin Leiden ( $\beta$ 6 or 7 Glu $\rightarrow$ 0) in a Thai Girl. *Haematologica*, 88(11), 153-155.

Sarnaik, S. A. (2005). Thalassemia and Related Hemoglobinopathies. *Indian J Pediatric*, 72(4), 319-324.

Scaringe, W. A., Li, K., Gu, D., Gonzalez, K. D., Chen, Z., Hill, K. A., & Sommer, S. S. (2008). Somatic microindels in human cancer : the insertions are highly error-prone and derive from nearby but not adjacent sense and antisense templates. *Human molecular genetics*, 17(18), 2910-2918. doi:10.1093/hmg/ddn190

Schechter, A. N. (2008). Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood Journal*, 112(10), 3927-3938. doi:10.1182/blood-BLOOD

Schroeder, W. A., Powars, D., Shelton, J. B., Shelton, J. R., Wilson, J. B., Huisman, T. H. J., & Bedros, A. A. (1982). An Unusual Phenotypic Expression of Hb-Leiden. *Biochemical Genetics*, 20(11/12), 1175-1187.

Sharma, V. S., Noble, R. W., & Ranney, H. M. (1974). Structure-function relation in hemoglobin Köln ( $\beta$ 98 val  $\rightarrow$  met). *Journal of Molecular Biology*, 82(2), 139-149.

Smith, R. D., Li, J., Noguchi, C. T., & Schechter, A. N. (2000). Quantitative PCR analysis of HbF inducers in primary human adult erythroid cells. *Blood Journal*, 95(3), 863-869.

So, C.-chiu, Chan, A. Y. Y., Tsang, S. T. Y., Lee, A. C. W., Au, W.-Y., Ma, E. S. K., & Chan, L.-C. (2006). A novel beta-delta globin gene fusion , anti-Lepore Hong Kong , leads to overexpression of delta globin chain and a mild thalassaemia intermedia phenotype when co-inherited with  $\beta$ 0 -thalassaemia. *British Journal of Haematology*, 136, 158-162. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06383.xJournal

Spritz, R. A., & Forget, B. G. (1983). The thalassemias: molecular mechanisms of Human Genetic Disease. *Am J Hum Genet*, 35, 333-361.

Srivastava, P., Kaeda, J. S., Roper, D., Vulliamy, T. J., Buckley, M., & Luzzatto, L. (1995). Severe hemolytic anemia associated with the homozygous state for an unstable hemoglobin variant (Hb Bushwick). *Blood*, 86(5), 1977-82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7655024>

Steinberg, M H, & Adams, J. G. (1983). Thalassaemic hemoglobinopathies. *The American journal of pathology*, 113(3), 396-409. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1916350&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Steinberg, Martin H., Forget, B. G., Higgs, D. R., & Weatherall, D. J. (2009). *Disorders of Hemoglobin. Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management*. (Martin H. Steinberg, B. G. Forget, D. R. Higgs, & D. J. Weatherall, Eds.) (Second Edi.). Cambridge University Press.

Taghavi Basmanj, M., Karimipoor, M., Amirian, A., Jafarinejad, M., Katouzian, L., Valaei, A., Bayat, F., et al. (2011). Co-inheritance of hemoglobin D and  $\beta$ -thalassemia traits in three Iranian families: clinical relevance. *Archives of Iranian medicine*, *14*(1), 61-3. doi:011141/AIM.0014

Taketa, F., Huang, Y., Libnoch, J., & Dessel, B. (1975). Hemoglobin Wood beta97 (FG4) His replaced by Leu. A new hemoglobin associated with familial erythrocytosis. *Biochim Biophys Acta*, *400*(2), 348-353.

Thein, S L, Best, S., Sharpe, J., Paul, B., Clark, D. J., & Brown, M. J. (1991). Hemoglobin Chesterfield (beta 28 Leu----Arg) produces the phenotype of inclusion body beta thalassemia. *Blood*, *77*, 2791-2793.

Thein, Swee Lay, Menzel, S., Lathrop, M., & Garner, C. (2009). Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. *Human molecular genetics*, *18*(2), 216-223. doi:10.1093/hmg/ddp401

Thein, Swee Lay. (2005). Hemoglobinopathy Pathophysiology of  $\beta$  Thalassemia — A Guide to Molecular Therapies. *Hematology*, 31-37.

Thillet, Joelle, Cohen-solal, M., Seligmann, M., & Rosa, J. (1976). Functional and Physicochemical Studies of hemoglobin St. Louis beta28 (B10) Leu->Gln. *The Journal of clinical investigation*, *58*, 1098-1106.

Thillet, J., Garel, M. C., Blouquit, Y., Basset, P., Dreyfus, B., Rosa, J., & Arous, N. (1977). Functional studies of Hb Malmo beta97 (FG4) His-->Gln. *Febs Letters*, *84*(1), 71-73.

Tondo, C. V., Salzano, F. M., & Rucknagel, D. L. (1963). Hemoglobin Porto Alegre, a possible polymer of normal hemoglobin in a Caucasian Brazilian family. *American journal of human genetics*, *15*, 265-79. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1932395&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Vekilov, P. G., Feeling-Taylor, A. R., Petsev, D. N., Galkin, O., Nagel, R. L., & Hirsch, R. E. (2002). Intermolecular interactions, nucleation, and thermodynamics of crystallization of hemoglobin C. *Biophysical journal*, *83*(2), 1147-56. doi:10.1016/S0006-3495(02)75238-7

Vella, F., & Lehmann, H. (1974). Haemoglobin D Punjab (D Los Angeles). *Journal of medical genetics*, *11*(4), 341-8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1013202&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Venselaar, H., Te Beek, T. a H., Kuipers, R. K. P., Hekkelman, M. L., & Vriend, G. (2010). Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC bioinformatics*, *11*(548). doi:10.1186/1471-2105-11-548
- Wajcman, H, Buckova, V., Haidas, S., & Labje, D. (1971). Consequences of heme loss in unstable hemoglobins: a study of hemoglobin Koln. *Febs Letters*, *13*(3), 145-148.
- Wajcman, H, & Galactéros, F. (1996). Abnormal hemoglobins with high oxygen affinity and erythrocytosis. *Hematology and cell therapy*, *38*(4), 305-312. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8891722>
- Wajcman, Henri, & Francina, A. (2009). Special issue: hemoglobin disorders. *Clinical biochemistry*, *42*(18), 1743-1744. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.10.016
- Weatherall, D J. (2001). Phenotype-Genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nature Genetics*, *2*(April), 245-255.
- Weatherall, D. J. (1998). Pathophysiology of beta thalassaemia. *Baillière's Clinical Haematology*, *11*(1), 127-146. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21705976>
- Weatherall, D J, & Clegg, J. B. (2001). Inherited haemoglobin disorders : an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization*, *79*(8), 704-712.
- White, J. M., Brain, M. C., Lorkin, P. a., Lehmann, H., & Smith, M. (1970). Mild "Unstable Haemoglobin Haemolytic Anaemia" caused by Haemoglobin Shepherds Bush (B74 (E18) Gly→Asp). *Nature*, *225*(5236), 939-941. doi:10.1038/225939a0
- Williamson, D., Nutkins, J., Rosthoj, S., Brennan, S., Williams, D., & Carrell, R. (1990). Characterization of Hb Aalborg , a new unstable hemoglobin variant , by fast atom bombardment mass spectrometry. *Hemoglobin*, *14*(2), 137-145.
- Wilson, C. I. D., Cave, R. J., Lehmann, H., Close, M., & Imai, K. (1984). Haemoglobin Warwickshire (beta5 [A2] Pro -> Arg ). A possible "fine tuning" of 2,3-DPG affinity by beta5 Pro. *Febs Letters*, *176*(2), 331-333.
- Wiwanitkit, V. (2008). Single amino acid substitution in important hemoglobinopathies does not disturb molecular function and biological process. *International Journal of Nanomedicine*, *3*(2), 225-227.
- Yonetani, T., Park, S., Tsuneshige, A., Imai, K., & Kanaori, K. (2002). Global Allosteric Model of Hemoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(37), 34508-34520. doi:10.1074/jbc.M203135200
- Zak, S. J., Geller, G. R., Rrivit, W., Tukey, D., Bernadine Brimhall, R. T. J., Bunn, H. F., & McCormack, M. (1976). A Hypothesis for the Increased Oxygen Affinity in Haemoglobin Malmö. *British Journal of Haematology*, *33*(1), 101-104.

Zanella-Cleon, I., Préhu, C., Joly, P., Riou, J., Becchi, M., Wajcman, H., & Francina, A. (2009). Strategy for identification by mass spectrometry of a new human hemoglobin variant with two mutations in Cis in the beta-globin chain: Hb S-Clichy [beta6(A3)Glu->Val; beta8(A5)Lys->Thr]. *Hemoglobin*, 33(3), 177-87. doi:10.1080/03630260903061184

Zimmerman, S. a, O'Branski, E. E., Rosse, W. F., & Ware, R. E. (1999). Hemoglobin S/O(Arab): thirteen new cases and review of the literature. *American journal of hematology*, 60(4), 279-84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10203101>