



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Ana Jorge Martins Rua Pinto

**RELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO NAS  
PATOLOGIAS DE MEMBRANA DO GLÓBULO  
VERMELHO**

**Dissertação no âmbito do mestrado em Biotecnologia  
Farmacêutica orientada pela Doutora Celeste Bento e pelo  
Professor Doutor João Nuno Sereno Almeida Moreira apresentada  
à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.**

Julho de 2023





UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Ana Jorge Martins Rua Pinto

**RELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO NAS PATOLOGIAS  
DE MEMBRANA DO GLÓBULO VERMELHO**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica orientada pela Doutora Celeste Bento e pelo Professor Doutor João Nuno Sereno Almeida Moreira apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2023

## **Agradecimentos**

Agradeço à Doutora Celeste Bento pelo empenho, esforço e dedicação que colocou na orientação deste trabalho e pela a oportunidade de realizar este trabalho na Unidade Funcional de Hematologia Clínica do CHUC.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira por ter aceite o desafio e orientar este trabalho.

À Doutora Teresa Fidalgo pelo acolhimento, cordialidade e disponibilidade demonstrados, que fizeram com que me sentisse em casa.

A toda a equipa da Unidade funcional de Hematologia Clínica, Ana Catarina Oliveira, Ana Teresa Simões, Catarina Silva Pinto, Elizabete Cunha, Margarida Coucelo e Patrícia Martinho pela grande disponibilidade para todas as explicações e dúvidas; e em especial ao Luís Relvas e à Janet Pereira pela paciência, acompanhamento e supervisão no trabalho laboratorial e dedicação no acompanhamento deste trabalho.

Às minhas colegas de estudo, Mariana, Carolina e Cristiana, pela amizade e partilha.

À minha família, marido e filhos, por todo o apoio e maturidade demonstrados durante este ano, que me fortaleceu e permitiu concluir esta etapa.

## Resumo

**Introdução:** A membrana eritrocitária é responsável pelas características mecânicas, transporte iónico e diversidade antigénica do glóbulo vermelho (GV). É composta por aproximadamente 20 proteínas principais e por, pelo menos mais 850 com diversas funções. A manutenção da integridade estrutural da membrana é essencial para que o eritrócito desempenhe as suas funções sem ser prematuramente destruído ou sequestrado pelo baço. As membranopatias (Esferocitose, Eliptocitose, Xerocitose e Piropoiquilocitose) são a causa mais comum de anemia hemolítica congénita e são fenotípica e genotipicamente muito heterogéneas. Os genes descritos em associação com patologia de membrana do eritrócito são o *ANK1* (anquirina), *SLC4A1* (banda 3), *SPTA1* ( $\alpha$ -espectrina), *SPTB* ( $\beta$ -espectrina), *PIEZO1* (canal piezo 1), *EPB41* (proteína 4.1), *EPB42* (proteína 4.2), *KCNN4* (canal Gardos), *GYPC* (glicoforina C) e *RHAG* (glicoproteína ligada ao grupo Rh). Existem variantes benignas no gene *SPTA1* chamados alelos de baixa expressão (*Lely*, *Lepra* e *Prague*), com alta frequência na população, que condicionam uma diminuição da proteína  $\alpha$ -espectrina; a mais abundante do citoesqueleto da membrana do eritrócito. O estudo molecular é de grande importância uma vez que os critérios de transmissibilidade genética, bem como o impacto das alterações genéticas na integridade da membrana carecem ainda de evidências; e por outro lado, juntamente com os estudos funcionais e dados clínicos, permitem clarificar a relação genótipo-fenótipo nestas patologias.

**Objetivos:** Fazer a caracterização molecular de doentes com anemia hemolítica e suspeita de membranopatia do GV, utilizando um painel de *Next Generation Sequencing* (NGS) desenhado para anemias hemolíticas e utilizar os perfis de ectacitometria para traçar uma relação genótipo-fenótipo nestas patologias.

**Material e métodos:** Foram estudadas 45 amostras de doentes com suspeita de patologia da membrana do GV após exclusão de anemia autoimune por teste de Coombs. Foram observados os esfregaços de sangue periférico (ESP) e realizados testes funcionais (ectacitometria e crioteste). Utilizou-se um painel de NGS concebido para anemias hemolíticas para fazer a caracterização molecular das amostras. A sequenciação de *Sanger* foi utilizada para confirmar as variantes encontradas nos doentes e quando possível para os estudos familiares. Foram também pesquisados os polimorfismos de baixa expressão nos doentes e familiares com variantes patogénicas no gene *SPTA1*.

**Resultados e discussão:** Foram identificadas 35 variantes, distribuídas por 6 dos genes descritos em associação com patologia de membrana do eritrócito (*ANK1*, *SPTB*, *SPTA1*, *SLC4A1*, *PIEZO1* e *EPB41*). Apenas em 11 casos não se identificaram variantes patogénicas ou provavelmente patogénicas que justifiquem o fenótipo e 19 das variantes encontradas não se encontram ainda descritas na literatura. Do estudo comparativo das curvas de ectacitometria obtidas foi possível estabelecer um padrão para cada tipo de membranopatia. As esferocitoses apresentaram uma curva com  $El_{máx}$  diminuído e  $O_{hyper}$  aumentado ou normal, as eliptocitoses apresentaram  $El_{máx}$  diminuído e um perfil achatado e as Xerocitoses uma curva deslocada à esquerda, com  $El_{máx}$  normal e  $O_{máx}$  e  $O_{hyper}$  diminuídos. Os outros estudos funcionais, crioteste e EMA não demonstraram ser tão eficazes no diagnóstico diferencial das membranopatias.

**Conclusões:** Num estudo com 45 amostras, encontrar mais de 50% de variantes não descritas e, adicionalmente, a caracterização molecular revelar grande heterogeneidade para pacientes com fenótipos semelhantes, torna evidente a importância de uma avaliação genética mais abrangente. A utilização de painéis de NGS nestas patologias irá trazer maior conhecimento dos padrões genéticos e do espectro de variantes genéticas, para ajudar no diagnóstico de membranopatias do GV. O estudo por ectacitometria demonstrou ser útil no diagnóstico diferencial das membranopatias, e o método mais rápido para identificar xerocitoses, principalmente quando a esplenectomia é uma opção de tratamento.

**Palavras-chave:** Eritrócito, anemia hemolítica, membranopatia, NGS, ectacitometria.

## Abstract

**Introduction:** The erythrocyte membrane is responsible for the mechanical characteristics, ion transport and antigenic diversity of the red blood cell (RBC). It is made up of approximately 20 main proteins and at least 850 more with various functions. Maintaining the structural integrity of the membrane is essential for the erythrocyte to fulfil its functions without being prematurely destroyed or sequestered by the spleen. Membranopathies (Spherocytosis, Elliptocytosis, Xerocytosis and Pyropoxycytosis) are the most common cause of congenital haemolytic anaemia and are phenotypically and genotypically very heterogeneous. Genes described in association with erythrocyte membrane pathology are *ANK1* (ankyrin), *SLC4A1* (band 3), *SPTA1* ( $\alpha$ -spectrin), *SPTB* ( $\beta$ -spectrin), *PIEZO1* (piezo channel 1), *EPB41* (protein 4.1), *EPB42* (protein 4.2), *KCNN4* (gardos channel), *GYPC* (glycophorin C) and *RHAG* (Rh group-linked glycoprotein). There are benign variants in the *SPTA1* gene called low expression alleles (Lely, Lepra and Prague), with high frequency in the population, which condition a decrease in the  $\alpha$ -spectrin protein; the most abundant of the erythrocyte membrane cytoskeleton. The molecular study is of great importance since the criteria of genetic transmissibility, as well as the impact of genetic defects on membrane integrity, still lack evidence; and on the other hand, together with functional studies and clinical information, they allow to clarify the genotype-phenotype relationship in these pathologies.

**Aims:** To perform molecular profiling of patients with haemolytic anaemia and suspected RBC membrane defects, using a Next Generation Sequencing (NGS) panel designed for haemolytic anaemias and to use ectacytometry profiles to trace a genotype-phenotype relationship in these pathologies.

**Material and methods:** We studied 45 samples from patients with suspected RBC membrane pathology after exclusion of autoimmune anaemia by Coombs test. Peripheral blood smears (PBS) were observed and functional tests (ectacytometry and cryotest) were performed. An NGS panel designed for haemolytic anaemias was used to perform molecular characterisation of the samples. Sanger sequencing was used to confirm variants found in patients and, when possible for family studies. Low-expression polymorphisms in patients and relatives with pathogenic variants in the *SPTA1* gene were also searched for.

**Results and discussion:** 35 variants were identified, distributed over 6 of the genes described in association with erythrocyte membrane pathology (*ANK1*, *SPTB*, *SPTA1*, *SLC4A1*, *PIEZO1* and *EPB41*). Only in 11 cases were no pathogenic or probably pathogenic variants identified to justify the phenotype and 19 of the variants found are not yet described in the literature. The comparative study of the ectacytometry curves obtained enabled a pattern to be established for each type of membranopathy. Spherocytoses present a curve with decreased  $El_{max}$  and increased or normal  $O_{hyper}$ , elliptocytoses present decreased  $El_{max}$  and a flattened profile and xerocytoses a curve shifted to the left, with normal  $El_{max}$  and decreased  $O_{max}$  and  $O_{hyper}$ . The other functional studies, cryotest and EMA did not prove to be as effective in the differential diagnosis of membranopathies.

**Conclusions:** In a study with 45 samples, finding more than 50% of undescribed variants and, additionally, the molecular characterisation revealing great heterogeneity for patients with similar phenotypes, makes evident the importance of a more comprehensive genetic evaluation. The use of NGS panels in these pathologies will bring greater knowledge of genetic patterns and the spectrum of genetic variants to aid in the diagnosis of RBC membranopathies. Ectacytometry study has proven to be useful in the differential diagnosis of membranopathies, and a faster method to identify xerocytosis when splenectomy is a treatment option.

**Keywords:** Red cell, haemolytic anaemia, membranopathy, NGS, ectacytometry.



# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	II
<b>Resumo</b> .....	III
<b>Abstract</b> .....	V
<b>Índice de Abreviaturas</b> .....	IX
<b>Índice de Tabelas</b> .....	X
<b>Índice de Figuras</b> .....	XI
<b>Introdução</b> .....	I
Ciclo do Glóbulo Vermelho.....	I
Doenças do Glóbulo Vermelho.....	3
Alterações congénitas do Glóbulo Vermelho.....	4
Hemoglobinopatias.....	4
Enzimopatias.....	6
Membranopatias.....	7
Classificação fenotípica das doenças de membrana.....	10
Esferocitose hereditária.....	12
Eliptocitose hereditária.....	13
Piroptocitose hereditária (HPP).....	14
Ovalocitose hereditária do Sudeste Asiático.....	15
Estomatocitose.....	15
Tratamento das membranopatias.....	17
Caracterização molecular da membrana eritrocitária.....	18
Gene ANK.....	18
Genes SPTA1 e SPTB.....	20
Gene SLC4A1.....	21
Gene EPB41.....	22
Gene PIEZO1.....	23
Gene KCNN4.....	24
Diagnóstico da Membranopatias.....	25
Parâmetros bioquímicos.....	26
Teste de crio-hemólise.....	27
Citometria de fluxo.....	27
Estudo de deformabilidade por ectacitometria.....	28
Estudo molecular dos genes.....	30
Classificação de variantes.....	30
<b>Objetivos</b> .....	33
<b>Material e Métodos</b> .....	34
Amostragem.....	34
Estudos funcionais.....	34
Crioteste.....	34
Ectacitometria de gradiente osmótico.....	35
Caracterização molecular.....	35
Extração.....	35
Sequenciação de Sanger.....	35

Estudos moleculares por painel de NGS.....	36
Análise bioinformática.....	37
<b>Resultados</b> .....	38
Grupo I- Amostras com variantes no gene ANK1.....	43
Grupo II- Amostras com variantes no gene SPTB.....	45
Grupo III- Amostras com variantes no gene SLC4A1.....	46
Grupo IV- Amostras com variantes no gene SPTA1.....	48
Grupo V- Amostras com variante no gene PIEZO1.....	52
Grupo VI- Amostras com variante no gene EPB41.....	53
<b>Discussão</b> .....	55
Grupo I.....	55
Grupo II.....	56
Grupo III.....	58
Grupo IV.....	59
Grupo V.....	61
Grupo VI.....	62
<b>Conclusões</b> .....	63
<b>Referências</b> .....	64
<b>Tabelas Suplementares</b> .....	76

## Índice de Abreviaturas

**DPG** - Difosfoglicerato

**Aa** - Aminoácido

**AD** - Autossômica dominante

**AH** - Anemia hemolítica

**AR** - Autossômica recessiva

**BFU-E** - Unidade de formação explosiva eritróide

**CF** - Citometria de fluxo

**CFU-E** - Unidade formadora de colônia eritroide

**CHCM** - Concentração de hemoglobina corpuscular média

**DHL** - Desidrogenase láctea

**DHS** - Estomatocitose hereditária desidratada ou xerocitose

**EH** - Esferocitose hereditária

**Elip H** - Eriptocitose hereditária

**PCR** - *Polimerase chain reaction* - Reação em cadeia da polimerase

**PK** - Piruvato quinase

**RDW** - *Red cell distribution width* - Índice de variação do tamanho dos eritrócitos

**RhAG** - Glicoproteína associada ao Rh

**UFC** - Unidade Formadora de Colônias

**VCM** - Volume corpuscular médio

**VUS** - Variante de significado indeterminado

**$\alpha$ -Tal** - Talassemia  $\alpha$

**$\beta$ -Tal** - Talassemia  $\beta$

**EMA** - Eosina-5-maleimida

**Epo** - Epoetina

**G6PD** - Glucose 6 fosfato desidrogenase

**GLUT1** - Transportador de glicose I

**GPI** - Glicosilfosfatidilinositol

**GV** - Glóbulo Vermelho

**Hb** - Hemoglobina

**HCM** - Hemoglobina corpuscular média

**HPP** - Piropoiquilocitose hereditária

**HSC** - Célula mãe hematopoiética pluripotente

**IL3** - Interleucina 3

**MAF** - *Minor allele frequency*- Frequência alélica minor

**NGS** - *Next generation sequencig* - Sequenciação de nova geração

## Índice de Tabelas

**Tabela 1** - Doenças dos eritrócitos, anemia, poliglobulia e suas principais características.

**Tabela 2** - Diferentes tipos de membranopatias, tendo em conta as variantes patogénicas atualmente identificadas e registadas – OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*).

**Tabela 3** - Caracterização das amostras em estudo.

**Tabela 4** - Caracterização molecular das variantes encontradas nas 45 amostras, agrupadas pelo gene em que se identificaram.

**Tabela 5** - Valores médios de Omin, Omáx, Elmáx e Ohyper para os 40 controlos normais utilizados no estudo e valores absolutos para cada amostra estudada por ectacitometria (**bold**-valores aumentados e **bold** - valores diminuídos em relação aos controlos).

**Tabela 6** - Casos com variantes identificadas no *ANK 1*, idades, género, parâmetros bioquímicos e estudos funcionais (Retic% - percentagem de reticulócitos, Bilir. Total-Bilirrubina total).

**Tabela 7** - Casos com variantes identificadas no *SPTB*, idades, género, parâmetros bioquímicos e estudos funcionais (Retic% - percentagem de reticulócitos, Bilir. Total-Bilirrubina total).

**Tabela 8** - Casos com variantes identificadas no *SLC4A1*, idades, género, parâmetros bioquímicos e estudos funcionais (Retic% - percentagem de reticulócitos, Bilir. total-Bilirrubina total).

**Tabela 9** - Casos com variantes identificadas no *SPTA1*, idades, género, parâmetros bioquímicos e estudos funcionais (Retic% - percentagem de reticulócitos, Bilir. total-Bilirrubina total).

**Tabela 10** - Caracterização molecular dos casos com a variante *SPTA1: c.4110delT* e familiares estudados; parâmetros bioquímicos e estudos funcionais.

**Tabela 11** - Casos com variantes identificadas no *PIEZO1*, idades, género, parâmetros bioquímicos e estudos funcionais (Retic% - percentagem de reticulócitos, Bilir. Total-Bilirrubina total).

**Tabela 12** - Caso com variante identificada no *EPB41*, idade, género, parâmetros bioquímicos e estudos funcionais (Retic% - percentagem de reticulócitos, Bilir. Total- Bilirrubina total).

## Índice de Figuras

**Figura 1** - Células precursoras do eritrócito durante o processo de Eritropoiese.

**Figura 2** - Esquema representativo da molécula de Hemoglobina e diferentes composições das suas cadeias globinicas.

**Figura 3** - Esquema da membrana do eritrócito em corte longitudinal (A) modificado (Bennett & Healy, 2008) e em corte transversal (B) mostrando o mosaico hexagonal do esqueleto da membrana.

**Figura 4** - Representação esquemática da estrutura da membrana do eritrócito e dos seus principais componentes funcionais. Abreviaturas: 4.1- proteína 4.1; 4.2- proteína 4.2; GLUT1- transportador de glicose 1; GPA- glicoforina A; GPC- glicoforina C; Rh- polipéptido rhesus; RhAG- glicoproteína associada ao Rh. (Kim *et al.*, 2017).

**Figura 5** - Esquema representativo da localização dos principais domínios funcionais na proteína anquirina (A); na sua cadeia de aminoácidos (B) e no gene ANKI (C).

**Figura 6.1** - Esquema representativo da localização dos principais domínios funcionais na proteína  $\alpha$ -espectrina (A); na sua cadeia de aminoácidos (B) e no gene SPTAI (C).

**Figura 6.2** - Esquema representativo da localização dos principais domínios funcionais na proteína  $\beta$ -espectrina (A); na sua cadeia de aminoácidos (B) e no gene SPTB (C).

**Figura 7** - Esquema representativo da localização dos principais domínios funcionais na proteína Banda 3 (A); na sua cadeia de aminoácidos (B) e no gene SLC4A1 (C).

**Figura 8** - Esquema representativo da localização dos principais domínios funcionais na proteína 4.1 (A), na sua cadeia de aminoácidos (B) e no gene EPB41 (C).

**Figura 9** - Ilustração dos módulos de mecanotransdução e poros do canal Piezo1 num modelo estrutural (esquerda) e num modelo topológico (direita). Adaptado de Ge *et al.* (2015) e Zhao *et al.* (2016).

**Figura 10** - Esquema representativo da localização dos principais domínios funcionais no canal Gardos (A); na sua cadeia de aminoácidos (B) e no gene KCNN4 (C).

**Figura 11** - Valores de referência dos hemogramas no homem, na mulher e em crianças.

**Figura 12** - Módulo Omoscan do *Laser-Assisted Optical Rotational Cell Analyzer* – LORRCA (Elmáx e Omáx refletem a deformabilidade; Elmin e Omin refletem a fragilidade osmótica e Elhyper e Ohyper refletem o estado de hidratação do GV).

**Figura 14** - Aspeto representativo das curvas padrão de ectacitometria para as principais patologias da membrana eritrocitária.

**Figura 15 - A-** Gráfico do número de variantes encontradas nos genes *ANK1*, *SLC4A1*, *SPTA1*, *SPTB*, *PIEZO1* e *EPB41*; **B** - Gráfico do tipo de variantes encontradas em cada um dos genes.

**Figura 16** - Osmoscans dos 40 controlos normais.

**Figura 17** - Gráficos de ectacitometria agrupados por gene em que se identificaram as variantes.

**Figura 18** – Eletroferograma - Variante *ANK1*: c.2920\_2921insGGGCCTCGCCAGCA identificada no caso 1 em heterozigotia por sequenciação de Sanger.

**Figura 19** – Esquema representativo da localização na proteína anquirina das variantes encontradas no *ANK1*; na sua cadeia de aminoácidos (Aa) e no gene (Exões *ANK1*). As variantes encontradas nos casos 38, 43, 19, 4, 38 e 8 localizam-se no domínio de ligação à membrana; a variante encontrada no caso 1 localiza-se no domínio de ligação à espectrina; e as variantes encontradas nos casos 42 e 3 encontram-se antes do domínio regulatório da anquirina.

**Figura 20** - (A) - ESP do caso 6 com alguns esferócitos; (B) - Identificação da variante *SPTB*: c.1264C>T em heterozigotia por sequenciação de Sanger (caso 6).

**Figura 21** - (A) - ESP com eliptócitos (seta amarela) e esferócitos (seta preta) do caso 34; e (B) - Identificação da variante *SPTB*: c.154C>T em heterozigotia por sequenciação de Sanger no caso 34.

**Figura 22** - Esquematização da localização na proteína β-espectrina das variantes encontradas no *SPTB*; na sua cadeia de aminoácidos (Aa) e no gene (*SPTB*-exões). A variante encontrada no caso 34 localiza-se no domínio de ligação à actina, a do caso 6 no domínio de dimerização, a do caso 7 nas repetições de espectrina, a do caso 32 no domínio de ligação à anquirina e a variante encontrada no caso 30 localiza-se no domínio de tetramerização da espectrina.

**Figura 23** - Identificação da variante *Banda 3 Coimbra* por NGS (A) e por sequenciação de Sanger (B) no caso 14.

**Figura 24** - Identificação da variante SLC4A1: c.1626+1G>A em heterozigotia por sequenciação de Sanger e alinhamento com a sequência de referência no Clustal Omega no caso 24.

**Figura 25** - Esquematização da localização na proteína banda 3 das variantes encontradas no SLC4A1, na sua cadeia de aminoácidos e no gene. As variantes identificadas nos casos 2, 31 e 10 localizam-se na parte citoplasmática da banda 3, as identificadas nos casos 25, 14 e 24 na parte transmembranar e a variante identificada no caso 40 encontra-se no domínio de transporte iónico da proteína banda 3.

**Figura 26** - Identificação das variantes SPTA1: c.5572C>G e c.6531-12C>T chamadas polimorfismo  $\alpha$ -Lely em homozigotia (A) e em heterozigotia (B); e da variante SPTA1: c.4339-99C>T chamada polimorfismo  $\alpha$ -Lepra (C) em heterozigotia por sequenciação de Sanger.

**Figura 27** - Esquema representativo da localização das variantes encontradas no gene SPTA1 na proteína  $\alpha$ -espectrina, na sua cadeia de aminoácidos e no gene.

**Figura 28** - Identificação da variante patogénica *frameshift* SPTA1: c.4110delT em heterozigotia por NGS (A) e por sequenciação de Sanger (B).

**Figura 29** - Heredograma do caso 9 (A) e Osmoscan do caso 9 e dos pais (B).

**Figura 30** - Osmoscan dos casos com a variante patogénica SPTA1: c.4110delT.

**Figura 31** - Heredograma do caso 17 (A) e curvas de ectacitometria do caso 17 e dos pais (B).

**Figura 32** - Osmoscan dos casos com grande deleção SPTA1 (casos 16, 17 e 26).

**Figura 33** - Esquema da localização da variante EPB41: c.1365+1G>T na proteína 4.1, na cadeia de aminoácidos e no gene EPB41.

**Figura 34** - ESP com maioria das células eliptócitos (A) e identificação da variante EPB41: c.1365+1G>T em heterozigotia por sequenciação de Sanger (B).

**Figura 35** - Curvas de ectacitometria das amostras estudadas agrupadas por patologia.

## Introdução

Os glóbulos vermelhos (GV) ou eritrócitos são as unidades morfológicas da série vermelha do sangue e constituem o tipo de célula mais abundante no organismo. Ao contrário da maioria das outras células, os GV maduros não contêm núcleo nem outros organelos (Mohandas *et al*, 2008). O seu principal componente é a hemoglobina (Hb), a proteína que lhes dá a cor vermelha e que se liga ao oxigénio para o transportar desde os pulmões até aos tecidos e órgãos pela corrente sanguínea. A Hb representa cerca de 90% do teor de proteína dos GV e é responsável pela viscosidade no citoplasma da célula (S M Lewis *et al*, 2006). A célula vermelha não nucleada é única entre as células humanas, na medida em que a membrana plasmática, o seu único componente estrutural, é responsável por todas as suas características de diversidade antigénica, transporte e mecânicas (Narla e Mohandas, 2017). As suas propriedades únicas conferem-lhe duas características principais: a capacidade de deformação e retorno à forma inicial (permitindo-lhes uma maior mobilidade através da estreita rede capilar) e conseguirem acomodar grandes quantidades de Hb (de modo a serem eficazes na sua principal função de transporte de oxigénio aos tecidos e retirada de dióxido de carbono para ser eliminado nos pulmões). O eritrócito humano bicôncavo normal tem um volume aproximado de 90 fL e uma área de superfície de  $140\mu\text{m}^2$ , o que apresenta um excesso de superfície de 40% em comparação com uma esfera do mesmo volume (Mohandas e Gallagher, 2008).

## Ciclo do Glóbulo Vermelho

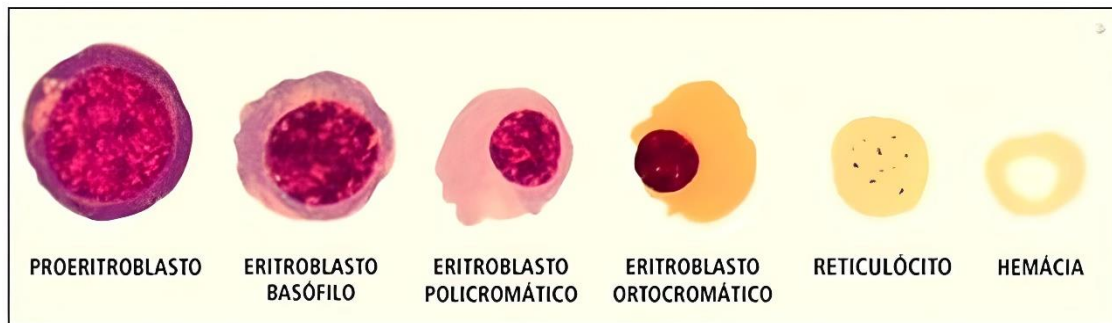
A eritropoiese é o processo de produção e maturação dos glóbulos vermelhos, que ocorre na medula óssea através da diferenciação das células estaminais hematopoiéticas (HSC) em eritrócitos maduros. Os eritrócitos, depois de estarem em circulação cerca de 120 dias, começam a expressar na sua capa lipídica fosfatidilserina (PS) que sinaliza a degradação pelos macrófagos (Magalhães Maia *et al.*, 2017) no baço e fígado. Durante a senescência, os eritrócitos normais perdem superfície e volume com pouca perda de hemoglobina e, como consequência, a densidade celular (viscosidade) aumenta progressivamente durante a sua vida útil. Os eritrócitos vão perdendo a sua capacidade de manter a homeostase catiónica, o seu volume celular aumenta e são eliminados da circulação (Lew & Tiffert, 2013). Uma vez fagocitados pelos macrófagos as cadeias polipeptídicas de globina dos eritrócitos são degradadas em aminoácidos enquanto o ferro é extraído do grupo heme. A molécula de ferro



será depois reutilizada na medula óssea em novos ciclos de eritropoiese enquanto o grupo heme é metabolizado em bilirrubina e excretada na urina e nas fezes. Num adulto saudável existe um equilíbrio constante entre o número de eritrócitos senescentes e a eritropoiese na medula óssea (Kaestner *et al*, 2014). Para manter a quantidade normal de GV no sangue (hematócrito) um adulto produz uma média de aproximadamente 2,4 milhões de novos GV a cada segundo (200 000 milhões diariamente).

## **Eritropoiese**

O saco vitelínico é o primeiro local onde ocorre a eritropoiese nas primeiras semanas de vida do embrião. Às seis semanas de vida uterina, os eritrócitos começam a ser produzidos e amadurecidos principalmente pelo fígado, baço e medula óssea e até aos 6-7 meses de vida fetal estes são os principais órgãos hematopoiéticos. A partir desta idade é a medula óssea o principal tecido hematopoiético, e durante a infância e vida adulta torna-se a única fonte de novas células sanguíneas (Magalhães Maia *et al*, 2017). A hematopoiese começa com a diferenciação de uma célula estaminal hematopoiética que é estimulada a proliferar e diferenciar-se na Unidade formadora de colónia mieloide (UFC). Esta, sob o estímulo da Interleucina 3 (IL3) e do fator estimulador de colónia granulocítico monocítico, na presença de eritropoietina (EPO) sofrerá diferenciação em unidade de formação explosiva eritroide (BFU-E) e unidade formadora de colónia eritroide (CFU-E) que perde a capacidade de diferenciação nas outras células sanguíneas e vai originar a primeira célula da linha eritroide, o pró-eritroblasto (Dzierzak *et al*, 2013). Seguidamente, 4 mitoses sequenciais dão origem a eritroblasto basófilo, eritroblasto policromatofílico e eritroblasto ortocromáticos (3 a 5 dias). Na fase de maturação ocorrem duas etapas importantes; primeiro a condensação e perda do núcleo com conseqüente perda de DNA e RNA, levando à diminuição do tamanho célula: e depois a hemoglobinação do citoplasma com alteração da sua afinidade aos corantes (Dzierzak *et al*, 2013). Da cor basófila azulada (com alta quantidade de DNA) passa a coloração rosada acidófila (rico em Hb no citoplasma). Com a perda do núcleo que é fagocitado por macrófagos medulares surgem os reticulócitos (Figura 1). Os reticulócitos saem da medula óssea, entram na circulação e por exocitose microvesicular perdem os organelos residuais. O aumento da concentração de Hb e perda de RNA leva à maturação do reticulócito em eritrócito maduro, discoide e bicôncavo (2 a 3 dias). São necessários no total, cerca de 7 dias para se observar uma resposta frente a uma alta necessidade de eritrócitos, como numa hemorragia ou num processo de anemia hemolítica (Tefferi *et al.*, 2003).



**Figura 1** - Células precursoras do eritrócito durante o processo de Eritropoiese; adaptado de (Bgl.Png (851×244), n.d.).

Um ciclo de *feedback* envolvendo a eritropoietina (EPO) ajuda a regular o processo de eritropoiese de modo a que a produção de eritrócitos seja igual à sua destruição, e esse número seja suficiente para manter níveis adequados de oxigênio no tecido, mas não tão alto que possa causar trombose ou acidente vascular cerebral (Dzierzak *et al* 2013). A EPO é uma proteína da família das citocinas, produzida no rim (cerca de 90%) e no fígado (cerca de 10%) em resposta a baixos níveis de oxigênio (hipóxia). É a EPO que estimula a diferenciação, multiplicação e maturação eritroides. Além da EPO é também necessário um aporte adequado de outras substâncias que constituem os eritrócitos (globina, vitaminas B12, B3, B6, ácido fólico, ferro e cobre) e outras hormonas (Mark J. Koury & Prem Ponka., 2004).

### **Doenças do Glóbulo Vermelho**

As doenças dos eritrócitos podem ser divididas em 2 grandes grupos: anemias e poliglobulias. Um valor de Hb abaixo dos valores médios definidos para a população normal, de acordo com a idade e género, é considerado anemia. Ao contrário da anemia, quando os níveis de Hb são elevados em relação ao valor normal, temos uma poliglobulia ou eritrocitose (que resulta de um aumento, congênito ou adquirido, da produção de eritrócitos). As anemias, por sua vez, podem ser divididas em 2 grupos diferentes: anemias hemolíticas e não hemolíticas, e ambas podem ser adquiridas ou congênicas (Tabela 1) (Magalhães Maia *et al*, 2017).

**Tabela I** - Doenças dos eritrócitos, anemia, poliglobulia e suas principais características, adaptado de (Magalhães Maia *et al.*, 2017).

Anemia	Não hemolítica	Adquirida	Anemia carencial (Ferropenia, déficit de vit. B12 ou ácido fólico)
			Anemia das doenças inflamatórias
			Anemia secundária a doença hepática ou renal
		Congênita	Anemia aplásica
			Síndromes de falha medular congênita
			Anemias sideroblásticas
			Formas ligeiras de hemoglobinopatias
	Hemolítica	Adquirida	Alterações do metabolismo do ferro
			Autoimunes
			Aloimunes
			Hemoglobinúria paroxística noturna
		Congênita	Infeções
			Microangiopatias
			Formas graves de hemoglobinopatias
Poliglobulia	Primária	Doença de membrana do eritrócito	
		Défices enzimáticos	
	Secundária	Anemias deseritropoiéticas congênicas	
		Microangiopatias	
	Idiopática	Adquirida	Policetemia Vera
		Congênita	Variantes patogénicas dos recetores da eritropoietina (EPO)
		Congênita	Insuficiência cardíaca, respiratória, tumores produtores de EPO, EPO exógena
			Variantes patogénicas nas vias dos sensores de oxigénio, hemoglobinas de alta afinidade, variantes 2-3 bisfosfoglicerato

### Alterações congénitas do Glóbulo vermelho

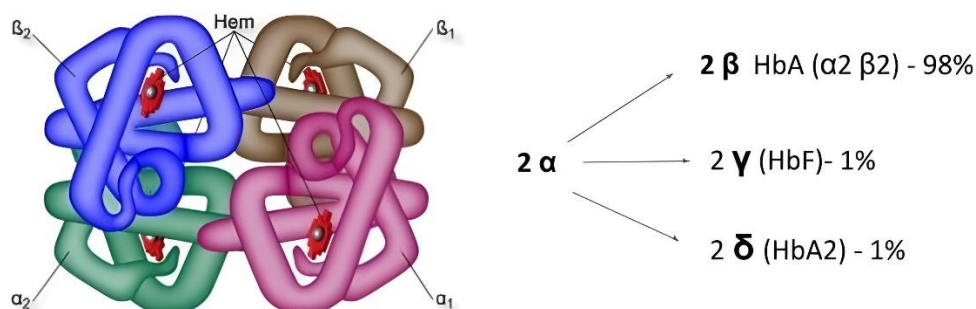
As alterações congénitas do GV podem dividir-se em três grandes grupos: hemoglobinopatias, enzimopatias e membranopatias.

#### Hemoglobinopatias

A Hemoglobina é formada por quatro cadeias polipeptídicas (podem ser cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) iguais duas a duas, com um grupo Heme por cadeia (Figura 2). As hemoglobinopatias resultam de variantes patogénicas nos genes das cadeias globínicas. Se a síntese de cadeias for reduzida ou nula (alteração quantitativa) ocorrem as talassemias; se as cadeias globínicas sintetizadas forem anormais (alteração qualitativa) designam-se variantes de hemoglobina (Krishnevskaya *et al.*, 2021).

Cerca de 98% da Hb nos indivíduos normais adultos é HbA (formada por 2 cadeias  $\alpha$  e 2 cadeias  $\beta$ ), cerca de 1% é HbF (2 cadeias  $\alpha$  e 2 cadeias  $\gamma$ ) e até 3% é HbA2 (2 cadeias  $\alpha$  e

2 cadeias  $\delta$ ) (Figura 2). Nos fetos, e até cerca de 6 meses de idade, a maior parte da Hb é HbF (Hemoglobina fetal) e por este motivo, alterações nos genes das cadeias  $\alpha$  e  $\gamma$  (HbF) manifestam-se logo no período fetal, enquanto as alterações das cadeias  $\beta$  e  $\delta$  (HbA e HbA2) apenas se manifestam depois do nascimento (Tamary *et al.*, 2020). Por outro lado, enquanto a informação para a produção das cadeias globínicas  $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  é dada por 4 genes (em duplicado), para as cadeias  $\beta$  é dada por apenas 2, pelo que variantes patogénicas nas cadeias  $\beta$  afetarão metade das cadeias produzidas, resultando maior impacto no fenótipo do que variantes patogénicas nos genes das outras cadeias.



**Figura 2-** Esquema representativo da molécula de Hemoglobina e diferentes composições das suas cadeias globínicas.

**Talassemias:** Alterações quantitativas no número de cadeias  $\alpha$  ( $\alpha$ -Talassemias ou  $\alpha$ -Tal) ou  $\beta$  ( $\beta$ -Talassemias ou  $\beta$ -Tal).

As  $\beta$ -Tal resultam de variantes pontuais no gene das cadeias globínicas  $\beta$  (gene HBB no cromossoma 11) e são  $\beta^+$  se a síntese é apenas reduzida ou  $\beta^\circ$  se a síntese é nula. As  $\beta$ -Tal são classificadas pela sua severidade em  $\beta$ -Talassemia menor (variante patogénica  $\beta$  em heterozigotia, com anemia ligeira, hipocromia, microcitose e HbA2 >3.5%),  $\beta$ -Talassemia major (variante patogénica  $\beta^\circ$  em homozigotia, com anemia severa dependente de transfusões, hipocromia e microcitose) e  $\beta$ -Talassemia intermédia (variante patogénica  $\beta^+$  em homozigotia, com anemia moderada não dependente de transfusões, hipocromia, microcitose e HbF aumentada). Os valores de Hb são normais ou apenas ligeiramente diminuídos.

As  $\alpha$ -Tal resultam mais frequentemente de grandes deleções no gene das cadeias globínicas  $\alpha$  (genes HBA1 e HBA2 no cromossoma 16). Estando duplicadas, a probabilidade de haver um emparelhamento desigual durante o *crossing-over* nos genes das cadeias  $\alpha$  é maior, resultando em deleções, normalmente com perda de 1 ou 2 genes. As deleções mais

frequentes são de 3.7 e 4.2 Kilopares de bases (Kpb) respetivamente ( $\alpha$  3.7 e  $\alpha$  4.2). Fenotipicamente podemos ter estados leves de  $\alpha$ -Talassemia (deleção de apenas um gene), estados intermédios (deleção de 2 genes, um de cada lado ou dois do mesmo lado) e estados graves (perda de 3 genes – HbH, ou dos 4 genes- H-Bart). Ao contrário das  $\beta$ -Tal major, que se manifestam a partir dos 4 primeiros meses de vida uma vez que o feto tem maioritariamente HbF, a não produção de cadeias  $\alpha$  leva a hidrósia fetal (Tamary *et al.*, 2020).

Variantes de Hb: Síntese de cadeias globínicas anormais. Neste caso o fenótipo depende das propriedades da Hb anormal, de qual o aminoácido substituído e do seu local na cadeia globínica (HbS, Hb Lepore, Hb M, Hb de alta afinidade, Hb instáveis, etc). Algumas variantes são de transmissão autossómica dominante (AD) como a Hb E, Hb Lepore e Hb de alta afinidade para o O<sub>2</sub> e outras são de transmissão autossómica recessiva (AR), como a HbS. Os indivíduos portadores de HbS, em heterozigotia são assintomáticos e têm parâmetros hematológicos normais, no entanto em homozigotia (SS) ou dupla heterozigotia (SC, SD, S/ $\beta$ -Tal) causam Drepanocitose, uma doença caracterizada por GV em forma de foice, que não conseguem transportar adequadamente o oxigénio, menos deformáveis e que tendem a obstruir os vasos sanguíneos (Mangla A *et al.*, 2022). A sua destruição prematura causa anemia, icterícia, palidez e crises dolorosas que requerem internamento hospitalar.

## Enzimopatias

O GV, sendo uma célula sem núcleo nem outros organelos, tem na Via glicolítica o único mecanismo de obtenção de energia. Esta via é uma sequência de dez reações com igual número de enzimas que ocorrem no citoplasma da célula e tem como objetivos principais sintetizar ATP para utilização celular e precursores utilizados noutros processos metabólicos (Zaninoni *et al.*, 2018); além de conferir potencial redutor através da síntese de NADH e NADPH. As enzimopatias são doenças raras, sendo as mais frequentes a deficiência de Piruvato quinase (PK) e a deficiência de glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD).

A reação geral da glicólise é:



O diagnóstico laboratorial destas patologias é baseado no doseamento da atividade enzimática utilizando métodos espectrofotométricos. Estes baseiam-se, na característica dos intermediários metabólicos NADH e do NADPH absorverem a 340 nm. A atividade

enzimática determina-se seguindo o aumento ou diminuição de absorvância a 340nm devido à produção ou consumo, de NADH ou NADPH. As técnicas são baseadas nas recomendações do ICSH - *International Committee for the Standardization in Haematology*, com modificações do Prof. Andrew Lestas. A manifestação clínica presente em qualquer enzimopatia é a anemia hemolítica e em alguns casos mais raros podem ocorrer alterações não hematológicas, como alterações neurológicas ou alterações musculares.

Estas doenças estão divididas em dois grupos: a) enzimopatias com hemólise crônica; b) enzimopatias com hemólise aguda. As enzimopatias com hemólise crônica estão associadas a alterações no metabolismo energético (síntese de ATP), tais como nas enzimas Piruvato quinase (PK), Glicose Fosfato Isomerase (GPI), Triose Fosfato Isomerase (TPI) e outras. As enzimopatias com hemólise aguda estão associadas á diminuição de potencial redutor do GV, o que acontece apenas no déficit da enzima Glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PD). O déficit de G6PD reduz a concentração de GSH (glutationa na sua forma reduzida), diminuindo a capacidade do GV se defender do efeito oxidante de certos fármacos (salicilatos e sulfonamidas) e também de alguns alimentos como as favas.

A deficiência de G6PD também conhecida como “favismo” é a enzimopatia mais frequente no mundo, tem transmissão ligada ao cromossoma X, e tem elevada prevalência em pessoas com ascendência africana, estando descrita como associada a um efeito protetor contra a malária.

## **Membranopatias**

Estrutura da membrana eritrocitária: A membrana eritrocitária é responsável pelas características mecânicas, transporte iônico e diversidade antigênica do GV (Wagner *et al.* 2010). É composta por aproximadamente 20 proteínas principais e por pelo menos outras 850 proteínas, com expressão e funcionalidades diferentes, incluindo proteínas de transporte, proteínas de adesão e recetores de sinalização (Van Vuren *et al.*, 2019). A organização estrutural da membrana dos glóbulos vermelhos permite-lhes sofrer grandes deformações reversíveis ao atravessar a estreita rede capilar e o condicionamento esplênico, enquanto mantém a sua integridade estrutural durante a sua permanência de 120 dias em circulação (Narla e Mohandas, 2017). A membrana dos glóbulos vermelhos apresenta um comportamento material único, sendo altamente elástica (100 vezes mais suave do que uma membrana de látex de espessura comparável), respondendo rapidamente às tensões fluidas

aplicadas (constantes de tempo na gama de 100 milissegundos), e é mais forte do que o aço em termos de resistência estrutural (Narla e Mohandas, 2017).

A membrana do GV é composta por uma bicamada lipídica ancorada a um citoesqueleto de espectrina.

A bicamada lipídica é composta por quantidades equivalentes de colesterol e fosfolípidos que se distribuem de forma assimétrica, com a fosfatidilcolina (28%) e a esfingomielinina (26%) localizadas no exterior, e a fosfatidilserina (PS) (13%) e a fosfatidiletanolamina (27%) no interior (Zwaal & Schroit, s.d.). Esta composição e distribuição lipídicas é responsável pela fluidez da matriz da membrana onde residem as proteínas transmembranas. Como os macrófagos reconhecem e fagocitam os eritrócitos que expõem a PS na superfície externa (sendo este o mecanismo que se pensa ser responsável pela eliminação dos eritrócitos senescentes), o confinamento deste lípido na camada interior é essencial para que a célula sobreviva ao seu frequente encontro com macrófagos do sistema reticuloendotelial, especialmente no baço (Narla e Mohandas, 2017).

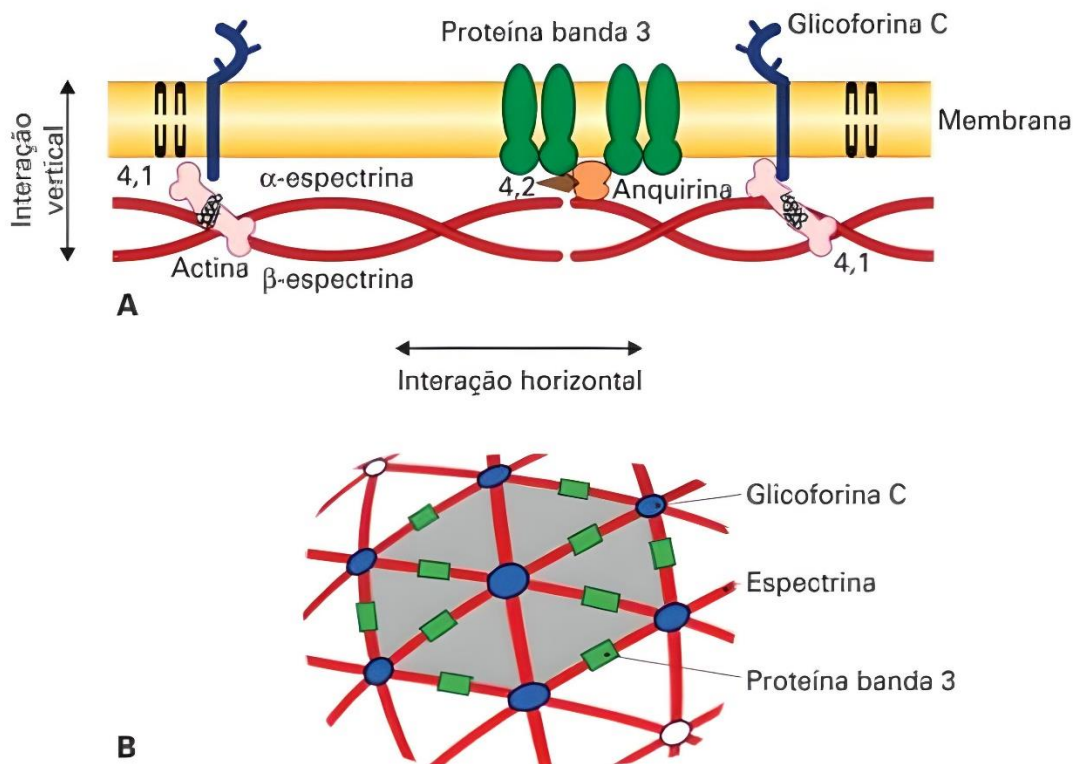
Podemos classificar as proteínas da membrana do eritrócito em proteínas integrais (incluídas na camada lipídica) e proteínas estruturais (que formam o esqueleto da membrana e se localizam na sua face interna) (Wagner *et al.*, 2010).

As proteínas integrais, ou transmembranares têm principalmente uma função de transporte (banda 3, canal Gardos e Piezo1) e exposição de antígenos (Rh) (Wagner *et al.*, 2010). Os eritrócitos humanos têm elevados conteúdos de  $K^+$  e baixos conteúdos de  $Na^+$  intracelulares quando comparados com as concentrações de iões correspondentes no plasma. A manutenção deste gradiente catiónico entre a célula e o seu ambiente envolve um movimento passivo de  $K^+$  para o exterior, que é bombeado de volta pela ação de uma bomba de  $Na^+/K^+$  dependente de ATP em troca de iões  $Na^+$  (Hoffman *et al.*, 2005). A outra grande função de algumas destas proteínas integrais (anquirina, proteína 4.2, actina, banda 3 e glicoforina C) é uma função estrutural, desempenhada pelos seus domínios citoplasmáticos, que interagem com as proteínas do citoesqueleto fazendo a sua ancoragem à bicamada lipídica (Andolfo *et al.*, 2016) (Figura 3 - A).

As proteínas estruturais formam uma rede esquelética bidimensional à base de espectrina e são: espectrina, actina, proteína 4.1, aducina, dematina, tropomiosina e tropomodulina. A espectrina é o principal componente desta rede e é composta por 2

subunidades ( $\alpha$  e  $\beta$ ). As suas cadeias são formadas por segmentos repetitivos de 106 aminoácidos enrolados em tripla hélice (20 cadeias  $\alpha$  homólogas e 16 segmentos de cadeia  $\beta$ ) (Wagner *et al.*, 2010). Formam heterodímeros (maioritariamente tetrâmeros) antiparalelos através de uma forte interação lateral entre as repetições 19 e 20 perto do terminal COOH da  $\alpha$ -espectrina com as repetições 1 e 2 perto do terminal NH2 da  $\beta$ -espectrina. A interação da espectrina com outras proteínas através de domínios de ligação específicos leva à formação de uma malha extensa que se pensa ser responsável pela manutenção da forma bicôncava dos eritrócitos humanos, pela regulação dos componentes da membrana plasmática e pela manutenção da assimetria lipídica da membrana plasmática (Machnicka *et al.*, 2014).

As extremidades dos tetrâmeros de espectrina convergem para um complexo de proteínas 4.1 formando o complexo juncional (Narla e Mohandas, 2017) (6 tetrâmeros de espectrina formando um arranjo pseudo-hexagonal ligados à proteína 4.1 (Figura 3- B).



**Figura 3** - Esquema da membrana do eritrócito em corte longitudinal (A) modificado (Bennett & Healy, 2008) e em corte transversal (B) mostrando o mosaico hexagonal do esqueleto da membrana.

A integridade estrutural da membrana é mantida principalmente por dois complexos macromoleculares de proteínas: O complexo da anquirina, composto por tetrâmeros de



banda 3 e RhAG (glicoproteína associada ao grupo Rh), que ligam a bicamada lipídica da membrana ao seu citoesqueleto através da interação dos seus domínios citoplasmáticos com a anquirina, que por sua vez se liga à  $\beta$  espectrina (a proteína 4.2 ligada à banda 3 e à anquirina regula as interações entre ambas); e o complexo da proteína 4.1, formado pelo complexo juncional e actina que se ligam a dímeros de banda 3, aductinas, glicoforina C, GLUT1 (proteína transportadora de glicose) e estomatina. Em conjunto os dois complexos fazem a ancoragem vertical da bicamada fosfolipídica ao citoesqueleto da membrana (Figura 3 - A) (Narla e Mohandas, 2017). A deficiência em qualquer dos componentes proteicos envolvidos no processo de ancoragem vertical da bicamada lipídica ao citoesqueleto do GV leva à perda de coesão da membrana e conseqüente perda de área de superfície desta com formação de esferócitos, enquanto ligações horizontais defeituosas (entre espectrinas  $\alpha$  e  $\beta$  ou entre espectrina-actina-proteína 4.1) levam a uma diminuição da integridade mecânica da membrana com formação de eliptócitos (Narla e Mohandas, 2017).

### **Classificação fenotípica das doenças de membrana**

As anemias hemolíticas congênitas compreendem um grupo de perturbações muito heterogêneas e raras causadas por alterações na estrutura, função de transporte, metabolismo, ou produção defeituosa de eritrócitos. Uma vez que a fisiopatologia de algumas formas raras é mal compreendida, as anemias hemolíticas representam um grupo de doenças que ainda carecem de ferramentas fáceis de aplicar para o diagnóstico, gestão clínica, e estratificação dos doentes (Fermo *et al.*, 2021).

As membranopatias são anemias hemolíticas congênitas resultantes de variantes patogênicas nos vários genes que codificam as proteínas que formam a estrutura da membrana eritrocitária (Andolfo *et al.*, 2016). A esferocitose, a eliptocitose, a piropoiquilocitose e a ovalocitose hereditárias são entidades com alteração primária da deformabilidade da membrana, enquanto a estomatocitose hereditária é determinada por uma alteração primária na sua permeabilidade. São anemias congênitas geralmente autossômicas dominantes ou com ocorrência “de novo”, com hemólise fundamentalmente extravascular e com alterações morfológicas características e muito heterogêneas, tanto genética quanto clinicamente. A variabilidade clínica depende do número de variantes, do tipo de variante e do local onde ela se manifesta na proteína (Fermo *et al.*, 2021).

A perda de deformabilidade celular não só compromete a capacidade do eritrócito de realizar de forma ótima a sua função de fornecimento de oxigénio aos tecidos, mas também pode levar à sua remoção prematura da circulação pelo baço (Um & Mohandas, 2008). Isto resulta numa anemia hemolítica com um aumento compensatório da produção de eritrócitos refletido pela reticulocitose, hiperbilirrubinemia, predisposição para o desenvolvimento de cálculos biliares e o desenvolvimento gradual da esplenomegalia (Tole *et al.*, 2020). Nas doenças por alteração da deformabilidade da membrana os autores são unânimes ao afirmar que o grau de gravidade da doença é diretamente proporcional à percentagem de diminuição da relação área de superfície/volume dos eritrócitos. Segundo o OMIM® (*Online Mendelian Inheritance in Man*), o maior banco de dados da relação entre genes e doenças, podem-se distinguir alguns tipos de membranopatias, tendo em conta as variantes patogénicas atualmente identificadas e registadas (Tabela 2).

**Tabela 2** - Diferentes tipos de membranopatias tendo em conta as variantes patogénicas atualmente identificadas e registadas – OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*).

Símbolo OMIM	Fenótipo	Nº Omim fenótipo	Gene/Locus	Proteína	Transcrito	Hereditariedade
<b>SPH1</b>	Esferocitose hereditária do tipo1	182900	ANK1 8p11.21	Anquirina I	NM_000037.4	AD/AR
<b>SPH2</b>	Esferocitose hereditária do tipo2	616649	SPTB 14q23.3	β-espectrina	NM_001355436.2	AD
<b>SPH3</b>	Esferocitose hereditária do tipo3	270970	SPTA1 1q23.1	α-espectrina	NM_003126.4	AR
<b>SPH4</b>	Esferocitose hereditária do tipo4	612653	SLC4A1 17q21.31	Proteína banda 3	NM_000342.4	AD
<b>SPH5</b>	Esferocitose hereditária do tipo5	612690	EPB42 15q15.2	Proteína banda 4.2	NM_001114134.2	AR
<b>EL1</b>	Eliptocitose hereditária do tipo1	611804	EPB41 1p35.3	Proteína banda 4.1	NM_001376013	AD/AR
<b>EL2</b>	Eliptocitose hereditária do tipo2	130600	SPTA1 1q23.1	α-espectrina	NM_003126.4	AD
<b>EL3</b>	Eliptocitose hereditária do tipo3	617948	SPTB 14q23.3	β-espectrina	NM_001355436.2	AD
<b>HPP</b>	Piroptocitose hereditária	266140	SPTA1 1q23.1	α-espectrina	NM_003126.4	AR
<b>SAO</b>	Ovalocitose do sudeste asiático	166900	SLC4A1 17q21.31	Proteína da banda 3	NM_000342.4	AD
<b>OHST</b>	Estomatocitose hereditária hiperhidratada	185000	RhAG 6p12.3	Glicoproteína Rh	NM_000324.3	AD
<b>DHS1</b>	Estomatocitose hereditária desidratada com ou sem pseudohiperkalemia e/ou edema perinatal	194380	PIEZO1 16q24.3	Componente I do canal iónico macanosensível de tipo Piezo	NM_001142864.4	AD
<b>DHS2</b>	Estomatocitose hereditária desidratada 2	616689	KCNN4 19q13.31	Proteína 4 intermediária da condutibilidade do canal cálcio-potássio ativado	NM_002250.3	AD
<b>CHC</b>	Criohidrocitose	185020	SLC4A1 17q21.31	Proteína banda 3	NM_000342.4	AD

## **Esferocitose hereditária**

Foram identificadas variantes patogénicas nos genes ANK1 (anquirina), SPTB ( $\beta$ -espectrina), SPTA1 ( $\alpha$ -espectrina), SLC4A1 (banda 3) e EPB42 (proteína 4.2) (Castilla *et al.*, 2023).

A banda 3, proteína 4.2 e anquirina (que se liga ao domínio  $\beta$  da espectrina), estabelecem as interações verticais entre a bicamada lipídica e o citoesqueleto da membrana. O défice ou disfunção destas proteínas perturba esta interação vertical (Perrotta *et al.*, 2008) originando ligações instáveis entre as proteínas e a dupla camada lipídica (Figura 4). Esta desestruturação da membrana leva à perda de lípidos e à formação de pequenas vesículas membranares lipídicas que são removidas pelo sistema retículo endotelial, o que vai diminuindo a superfície da membrana com a consequente redução da relação superfície-volume (esferócitos) e da capacidade de deformação (Gallagher *et al.*, 2005).

As características anatómicas do sistema vascular do baço formam um grande filtro que acaba por aprisionar as células com deformabilidade reduzida, aumentando o tamanho do órgão (esplenomegalia) e criando várias condições de stress aos eritrócitos lesados conhecidas como condicionamento esplênico. O condicionamento esplênico em condições fisiológicas serve para sequestrar e degradar os eritrócitos envelhecidos (com baixo pH resultante da perda de água, mais esferocíticos e menos deformáveis), nas patologias de membrana do GV, o condicionamento esplênico é desencadeado pela hemoconcentração e diminuição da circulação dos eritrócitos no órgão, que resultam numa diminuição do pH e consequente limitação das enzimas envolvidas na produção de ATP. Esta acumulação de células lesadas aumenta o tempo de contacto com os macrófagos no baço e prepara-as para serem hemolisadas, o que acabará por acontecer no baço ou nouro órgão do sistema reticuloendotelial. As células que escapam do baço e voltam à circulação são as características células microcíticas e hiperdensas (esferócitos) observadas na esferocitose hereditária (Gallagher, 2005).

A esferocitose hereditária (EH) é a doença das membranas mais frequente, com maior incidência no Norte da Europa (1/2.000-5.000) (Chonat *et al.*, 2019). É um grupo de anemias hereditárias heterogéneas que mostram um amplo espectro de gravidade clínica mesmo dentro da mesma família, desde as formas assintomáticas até às formas mais severas e dependentes de transfusão (Um & Mohandas, 2008). A deficiência de anquirina é a causa mais comum de EH, responsável por cerca de 50% a 60% dos casos, com diferentes graus de anemia,

desde ligeira a grave. Pensa-se que aproximadamente 70% da EH é herdada de forma autossômica dominante (AD) através de variantes patogénicas no *ANK1*, *SPTB* e *SLC4A1*. 10% serão causados por variantes patogénicas no *SPTA1* e *EPB42* herdadas de forma autossômica recessiva (AR) e os restantes 20% são variantes *de novo* que surgem quase exclusivamente no *ANK1*, *SPTB* ou *SLC4A1* (Tole *et al.*, 2020). A EH recessiva grave é mais frequentemente devido a variantes patogénicas bialélicas *SPTA1* que resultam numa diminuição significativa da expressão normal das proteínas de ambos os alelos uma vez que dois alelos *SPTA1* normais permitem a sobreprodução de cadeias de  $\alpha$ -espectrina (Da Costa *et al.*, 2016).

Na EH a anemia pode estar presente ou ausente, sendo na maioria dos doentes leve (Hb >11 g/dL) ou moderada (Hb 8-11 g/dL) (Andolfo *et al.*, 2016). Ocorre sempre reticulocitose, refletindo hemólise e tentativa de compensação medular. A presença de esferócitos é uma característica da doença, embora isso possa ocorrer também na anemia hemolítica autoimune, que deve ser excluída pelo teste de Coombs. Ocorre aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), reflexo de células desidratadas e que perderam mais membrana do que conteúdo de hemoglobina e VCM (volume corpuscular) normal ou ligeiramente diminuído (Magalhães Maia *et al.*, 2017).

### **Eliptocitose hereditária**

Foram identificadas variantes patogénicas nos genes *SPTA1* ( $\alpha$ -espectrina), *SPTB* ( $\beta$ -espectrina) e *EBP41* (proteína 4.1) (Chonat *et al.*, 2014).

A principal alteração dos eritrócitos na eliptocitose hereditária (Elip H) é a diminuição da fragilidade mecânica do esqueleto da membrana do GV devido a ligações horizontais defeituosas das proteínas citoesqueléticas, tais como interações dímero-dímero de espectrina e espectrina-actina-proteína 4.1 no complexo juncional (Figura 4) (Niss *et al.*, 2016). A principal característica é a presença de eliptócitos (glóbulos vermelhos alongados com extremidades quase simétricas) que nem sempre causam anemia hemolítica.

A sua incidência é de 1/2.000-4.000 indivíduos, e é muito superior no continente africano. A frequência estimada de variantes patogénicas nos diferentes genes é *SPTA1* (65%), *SPTB* (30%) e *EPB41* (5%) (Niss *et al.*, 2016). A maioria dos pacientes com eliptocitose apresenta herança autossômica dominante e a sua alta prevalência em regiões endêmicas de malária pressupõe um mecanismo de proteção contra o *Plasmodium*. As variantes patogénicas

na proteína 4.1 são mais frequentes na população caucasiana em comparação com as da espectrina, que são muito mais frequentes na população africana.

Estima-se que cerca de 80% dos pacientes sejam assintomáticos, sem anemia ou esplenomegalia, pelo que a verdadeira incidência na população pode ser subestimada. Por outro lado, dada a falta de relevância clínica, o diagnóstico de eliptocitose pode ser feito em qualquer idade. A forma eliptocítica conduz a hemólise apenas se a proteína mutada causar uma diminuição significativa na estabilidade da rede de proteínas. Fundamentalmente, variantes patogénicas que afetam a área de associação de heterodímeros em tetrâmeros ou onde eles entram em contato com  $\alpha$  e  $\beta$ -espectrinas alcançarão uma estrutura muito mais instável e portanto, mais hemólise (Ipsaro et al., 2010).

### **Piropoiquilocitose hereditária (HPP)**

É a expressão mais grave da Elip H, com afetação bialélica da espectrina e portanto de transmissão autossómica recessiva. O paciente é homocigótico ou duplo heterocigótico para variantes patogénicas ou, mais frequente, é duplo heterocigótico para uma variante patogénica num alelo herdado em *trans* com um polimorfismo de baixa expressão no *SPTA1* (Niss et al., 2016).

No gene *SPTA1* (que codifica a  $\alpha$ -espectrina) foram identificados polimorfismos com prevalências relativamente elevadas na população, responsáveis pela diminuição da produção de cadeias de  $\alpha$ -espectrina chamados alelos de baixa expressão. O polimorfismo *Low expression Lyon* ou  $\alpha$ -Lely consiste na variante *SPTA1:c.5572C>G* no exão 40 juntamente com a variante *SPTA1:c.6531-12C>T* no intrão 45, causando um splicing alternativo que resulta numa redução de 50% na quantidade de  $\alpha$ -espectrina produzida (N. Alloisio et al., 1991); o polimorfismo *Low expression prague* ou  $\alpha$ -Lepra consiste na variante *SPTA1:c.4339-99C>T* no intrão 30 e resulta numa produção de apenas 16% da quantidade de  $\alpha$ -espectrina (Garbarz et al., 1990) e o polimorfismo  $\alpha$ -Prague consiste na variante *SPTA1:c.5190-2A>G* no intrão 36 que resulta numa proteína  $\alpha$ -espectrina truncada (Wichterle et al, 1996). Estes polimorfismos de baixa expressão, por si só, são menos relevantes, uma vez que as cadeias de  $\alpha$ -espectrina são produzidas em excesso (3 a 4 vezes em comparação com as cadeias  $\beta$ ).

Na HPP estão presentes fragmentação celular e microcitose nos quadros mais graves, em geral associados a anemia e reticulocitose. A fragmentação celular pode mascarar o achado

de eliptócitos no esfregaço, o que dificulta o diagnóstico desta variante de eliptocitose. O exame dos pais é imprescindível nesses casos e vai mostrar um deles com aspeto eliptocitário típico (Gallagher *et al.*, 2004).

No período neonatal, pode-se observar um quadro transitório (vários meses) de piropoiquilocitose, com hemólise significativa e morfologia eritrocitária muito alterada. Esta é uma condição atribuída à Hb F predominante que não se liga bem à enzima eritrocitária 2-3 DPG (difosfoglicerato) e o aumento dessa enzima causa uma desestabilização mecânica que se expressa numa membrana basal instável ocorrendo hemólise. Após um ano de vida, a criança permanece independente de transfusão e com o fenótipo de eliptocitose hereditária de um dos pais.

### **Ovalocitose hereditária do Sudeste Asiático**

É uma condição de transmissão AD causada pela eliminação de 27 nucleótidos no gene SLC4A1, levando à perda de 9 aminoácidos (400-408) da proteína da banda 3. É um distúrbio muito comum em áreas endêmicas de malária do Sudeste Asiático, como Malásia, Filipinas, Indonésia (5-25% dos portadores da população). Os glóbulos vermelhos são caracterizados pela sua forma ovalóide cruzada por 1 ou 2 linhas ou estômatos. Os portadores adultos não apresentam anemia, embora hemólise e hiperbilirrubinémia sejam frequentes nos recém-nascidos. O diagnóstico é baseado na presença de mais de 30% de ovalócitos com estômatos no esfregaço, a ausência ou dados mínimos de hemólise e a origem da área geográfica de influência (Martínez *et al.*, 2022).

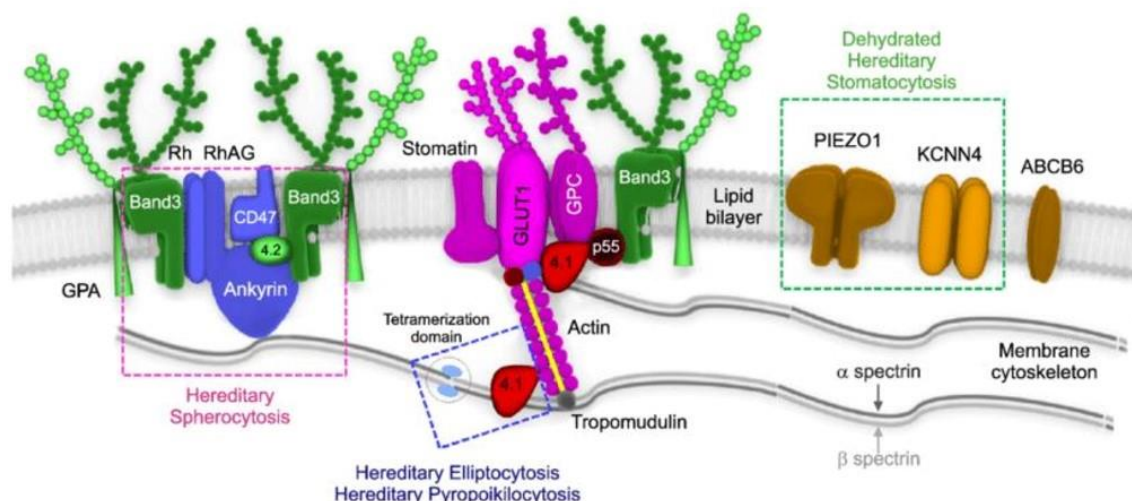
### **Estomatocitose**

É a condição que resulta na alteração da permeabilidade da membrana do eritrócito aos catiões monovalentes  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , com a consequente alteração do conteúdo catiónico intracelular e alterações do volume celular e sua viscosidade (Delaunay J *et al.*, 2004). Quando há perda de conteúdo catiónico e consequente saída de água da célula por osmose temos estomatocitose desidratada ou xerocitose, com um CHCM aumentado ( $>36$  g/dL). Se o resultado final for um aumento líquido nos catiões dentro do eritrócito, mais água entra por osmose, resultando em glóbulos vermelhos super-hidratados (estomatócitos ou hidrócitos). Em ambos os casos, ocorre alteração da morfologia e hemólise (Albuisson *et al.*, 2013). A presença de estomatócitos (glóbulos vermelhos com uma depuração central em forma de

boca ou estoma) dá o nome a este grupo de anemias, embora também se observem em várias situações adquiridas como doenças hepáticas ou utilização de medicamentos (clorpromazina). É importante salientar que a presença de estomatócitos nem sempre será causada por distúrbio de permeabilidade iônica, e por serem anemias hemolíticas macrocíticas por vezes requerem um diagnóstico diferencial com anemias diseritropoiéticas congênicas; a menor elevação de reticulócitos e, sobretudo, os dados medulares de diseritropoiese dessas anemias medulares esclarecem o diagnóstico.

Estomatocitose desidratada (xerocitose):

Foram identificadas variantes patogênicas nos genes PIEZO1 e KCNN4 (canal Gardos) (Figura 4).



**Figura 4** - Representação esquemática da estrutura da membrana do eritrócito e dos seus principais componentes funcionais. Abreviaturas: 4.1, proteína 4.1; 4.2, proteína 4.2; GLUT1, transportador de glicose I; GPA, glicoforina A; GPC, glicoforina C; Rh, polipéptido rhesus; RhAG, glicoproteína associada ao Rh. (Kim et al., 2017).

A estomatocitose hereditária desidratada (DHS), também conhecida como xerocitose hereditária, é uma anemia hemolítica AD caracterizada por desidratação eritrocitária primária (Albuisson et al., 2013). Os eritrócitos DHS exibem uma diminuição do conteúdo total de cátions e potássio que não são acompanhados por um ganho líquido proporcional de sódio e água. Devido ao aumento da viscosidade, os xerócitos têm também menos deformabilidade o que leva à hemólise. Os doentes com DHS exibem tipicamente anemia hemolítica compensada ligeira a moderada, com um aumento da CHCM eritrocitária e diminuição da fragilidade osmótica que refletem desidratação celular (Zarychanski et al., 2012). É o distúrbio mais

comum em estomatocitose hereditária, com incidência de 1 em 50.000 nascimentos e 15-20 vezes menos frequente que a esferocitose hereditária.

#### Estomatocitose com hiper hidratação:

Foram encontradas variantes no gene RHAG.

A forma "clássica" é muito rara, não havendo mais de 20 famílias publicadas, é herdada de forma autossômica dominante e comporta-se como anemia hemolítica moderada ou grave, com estomatócitos frequentes (40-60%), aumento acentuado do VCM até valores de 140 fL e diminuição do CHCM (Jamwal M et al., 2016).

### **Tratamento das membranopatias**

As anemias hemolíticas congênitas por alterações da membrana eritrocitária podem resultar de diferentes variantes patogênicas nos vários genes que codificam as proteínas que formam a estrutura da membrana, e deste modo as suas manifestações clínicas são também muito diferentes, desde anemia leve (aumento da hemólise no baço, sendo integralmente compensado por um aumento da produção de novos eritrócitos, o que evita a instalação de um quadro de anemia); moderada (Hb: 80-120 g/L); ou grave (Hb hemoglobina < 8 g/dl e reticulócitos > 10 %) (Andolfo et al., 2016). As formas mais leves da doença geralmente não necessitam de tratamento especial, exceto quando exista crise hemolítica agravada por alguma infecção viral concomitante. Como em todas as anemias hemolíticas crônicas, a necessidade de folatos para produção de novos eritrócitos está aumentada, sendo indicada a suplementação com ácido fólico (1 a 5 mg/dia). Nas formas mais graves da doença, o grau da anemia hemolítica instalada poderá necessitar de:

Transfusões de sangue, para repor o nível basal de hemoglobina e garantir a eficiência do transporte de gases;

Eliminação do ferro em excesso na circulação (resultante da destruição dos eritrócitos e da exagerada degradação da hemoglobina) por agentes quelantes, para evitar a formação de depósitos anormais do metal em vários órgãos;

Retirar a vesícula biliar (colecistectomia) devido à hiperbilirrubinemia resultante da degradação do grupo Heme da Hb;

Esplenectomia, ou seja, a retirada cirúrgica do baço (Abdullah et al., 2009).



O baço é o local primário de aprisionamento e ruptura de glóbulos vermelhos em todas as doenças de membrana, sendo o tamanho da esplenomegália um critério de gravidade clínica nestas doenças. A esplenectomia é considerada curativa nalguns casos, mas está, no entanto, contra-indicada na estomatocitose hereditária devido ao alto risco de graves problemas vasculares trombóticos arteriais e venosos (os estomatócitos têm maior aderência ao endotélio vascular) que permanecem ao longo da vida (King *et al.*, 2015). O diagnóstico diferencial entre esferocitose hereditária e estomatocitose é essencial antes de se decidir pela esplenectomia. Na piropoiquilocitose em que a hemólise é grave, a esplenectomia diminui a hemólise, mas se persistirem grandes necessidades de transfusão, o transplante alogênico seria a terapia a ser considerada. Há poucas evidências escritas nesses pacientes sobre a eficácia da esplenectomia, mas parece que a hemólise permanece, embora diminuída, pois devido à grande instabilidade da membrana, os eritrócitos também se rompem fora do baço.

Por outro lado, a esplenectomia também implica um risco de problemas infecciosos (o mais temido é a sepsis fulminante por *Streptococcus pneumoniae*) pelo que não há indicação em crianças com menos de 6 anos, quando os eventuais riscos de responder inadequadamente a eventuais infecções são maiores. É sempre necessária a imunização dos doentes de acordo com os regulamentos de vacinação em vigor (bactérias encapsuladas como *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*), o que diminui, mas não elimina o risco de infecção grave. É importante lembrar a necessidade de reimunização, principalmente em pacientes adultos esplenectomizados na infância (Attina' G *et al.*, 2021). A esplenectomia subtotal (reduz a hemólise sem resolvê-la completamente, mas preserva a função fagocitária pelo baço residual e, com isso, teoricamente a ameaça de sepsis), de acordo com estudos recentes tem-se mostrado benéfica, principalmente em crianças menores de 6 anos com anemia grave, pois a Hb aumenta e diminui a necessidade de transfusões, o que permite o crescimento e atividade normais, embora posteriormente muitos deles necessitem de esplenectomia total que pode ser realizada numa idade mais segura.

## **Caracterização molecular da membrana eritrocitária**

### **Gene ANKI**

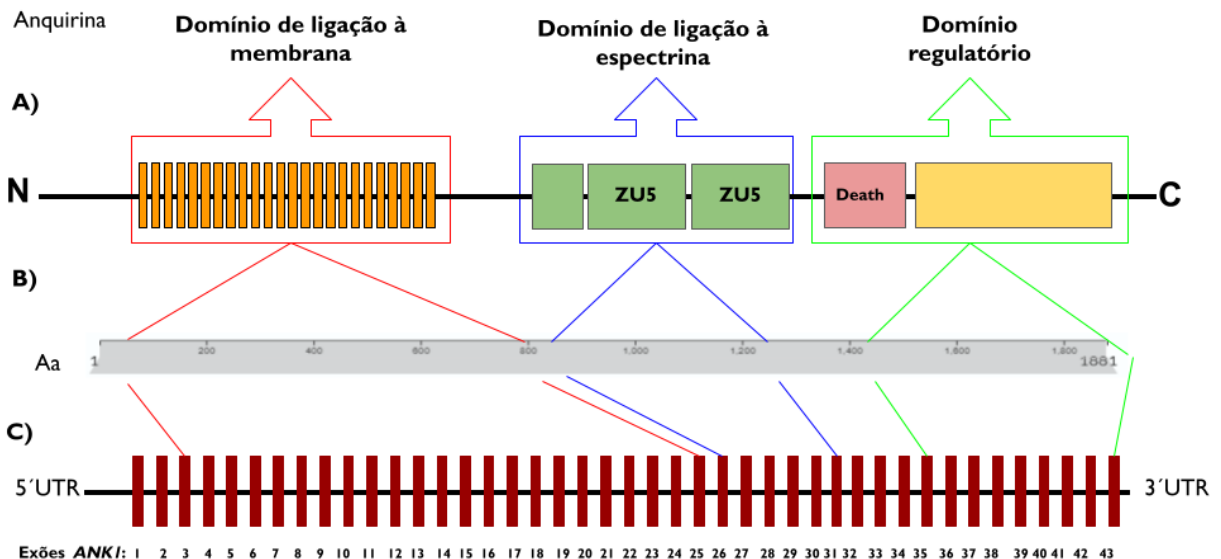
O gene ANKI, localizado no cromossoma 8 codifica a proteína anquirina do GV. Constituído por 8292 pares de bases e 43 exões que codificam para os 1880 aminoácidos da

anquirina (Ensembl genome browser 109. (n.d.)). A anquirina da membrana dos GV (NM\_000037.4) é uma proteína constituída por três domínios funcionais principais (Figura 5):

- O domínio de ligação à membrana (Aa 44- 904): Medeia a ligação da anquirina às proteínas integrais da membrana e as interações com uma variedade de canais de iões, transportadores e moléculas de adesão celular. Contém 24 repetições (ANK repeats) cada uma com 33 aminoácidos dispostos antiparalelamente formando hélices seguidas de um laço (*Super-helical*) (ANK1 - Ankyrin-I - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt).

- O domínio de ligação à espectrina (Aa 913-1216): Responsável pela ligação do complexo proteico associado à anquirina ao citoesqueleto de actina-espectrina. Este domínio é relativamente grande com um peso molecular de 62 kD, mas o domínio mínimo de ligação à espectrina está contido num motivo ZU-5 de 160 aminoácidos.

- O domínio regulatório C-terminal (Aa 1403-1881): Composto por um domínio *death* e uma parte não estruturada de 300 aminoácidos. Este domínio regula as interações proteicas com os domínios de ligação da anquirina à membrana e de ligação à espectrina. Esta atividade reguladora parece ser mediada por uma interação intramolecular entre este domínio e a primeira repetição de anquirina do domínio de ligação à membrana (Cunha e Mohler, 2009).

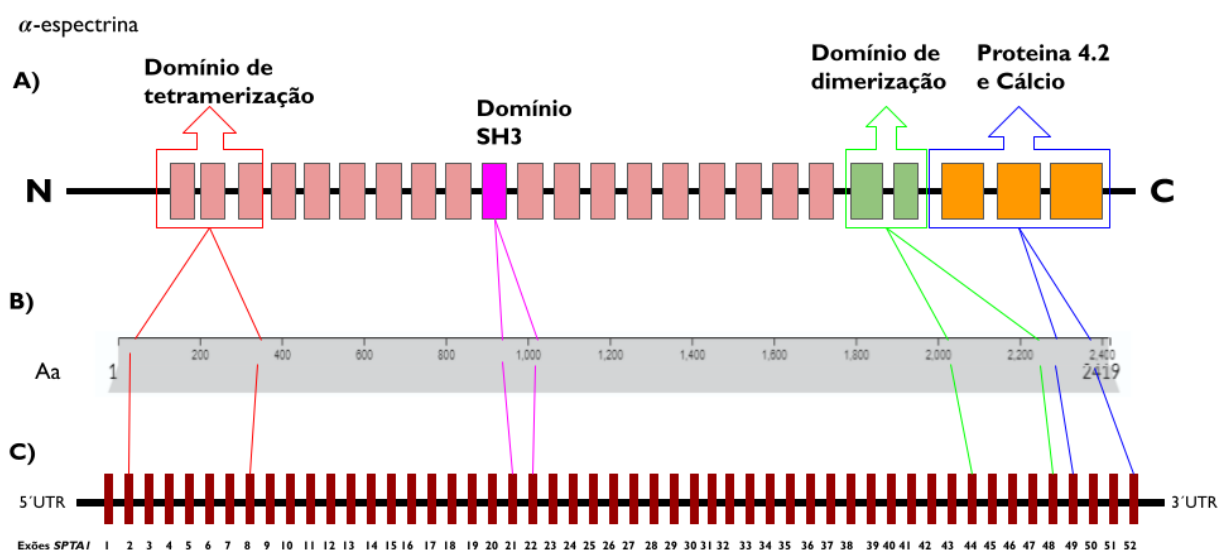


**Figura 5** - Esquema representativo da localização dos principais domínios funcionais na proteína anquirina (A); na cadeia de aminoácidos (B) e no gene ANK1 (C).

## Genes SPTAI e SPTB

O gene SPTAI, localizado no cromossoma 1 codifica a proteína  $\alpha$ -espectrina (NM\_003126.4) e o gene SPTB localizado no cromossoma 14 a  $\beta$ -espectrina (NM\_001355436.2), que são as proteínas mais abundantes na membrana do GV e juntas formam a rede do citoesqueleto da célula.

O gene SPTAI, com 8018 pares de bases, é formado por 52 exões que codificam para os 2419 aminoácidos (aa) da  $\alpha$ -espectrina (Ensembl genome browser 109. (n.d.)). A proteína  $\alpha$ -espectrina é constituída por 20 repetições de aa (Aa 53-2258), um domínio SH3 (Aa 977-1036) entre as repetições 9 e 10 e três domínios finais EF-hand 1, EF-hand 2 e EF-hand 3 (Aa 2271- 2386). As três primeiras repetições (1 a 3) Aa 55 –367, formam o domínio de tetramerização e as duas últimas (19 e 20) Aa 2040-2257 o domínio de dimerização (Figura 6.1). O domínio SH3 está envolvido na ligação a proteínas alvo, incluindo proteínas associadas ao citoesqueleto de actina. Os domínios finais EF-hand 1, 2 e 3 têm uma função reguladora relacionada com a ligação ao cálcio e a alterações conformacionais induzidas na proteína, catalisando frequentemente reações enzimáticas (ANK1 - Ankyrin-1 - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt).

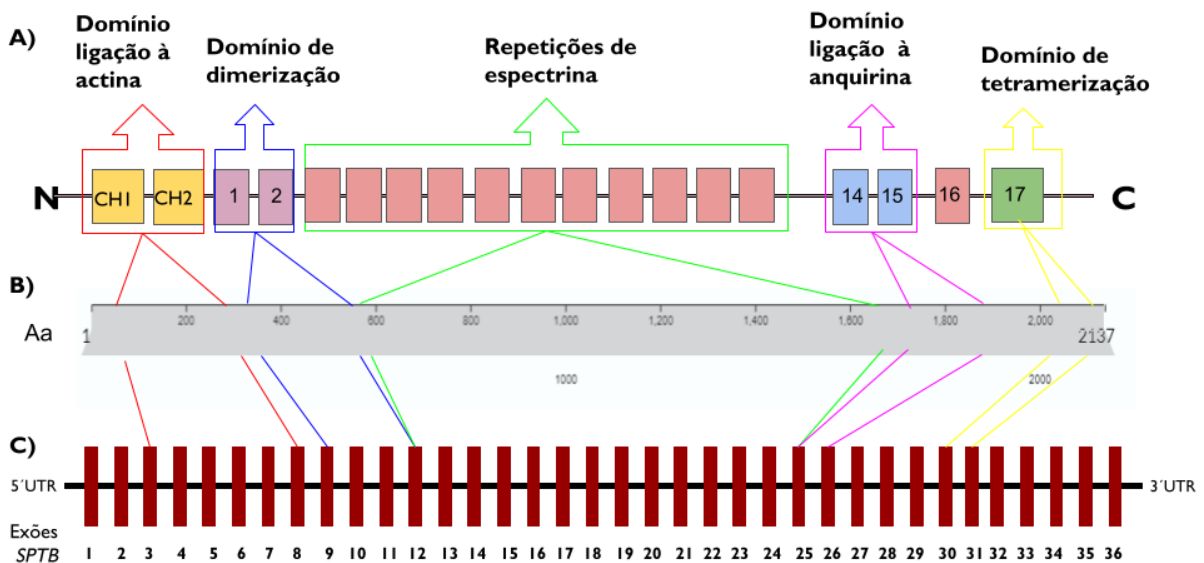


**Figura 6.1-** Esquema representativo da localização dos principais domínios funcionais na proteína  $\alpha$ -espectrina (A); na cadeia de aminoácidos (B) e no gene SPTAI (C).

O gene SPTB tem 10177 pares de bases e 36 exões. 35 exões são codificantes para os 2328 aminoácidos que constituem a proteína  $\beta$ -espectrina (Ensembl genome browser 109.

(n.d.)). Na  $\beta$ -espectrina existem dois domínios iniciais CHI e CH2 (Aa 54-278) responsáveis pela ligação à actina e 17 repetições de espectrina (Aa 303- 2075). As primeiras duas repetições estão envolvidas na dimerização (Aa 303-525), as repetições 14 e 15 na ligação à anquirina (Aa 1690-1899) e a repetição 17 na formação dos tetrâmeros de espectrinas (Aa 2013-2075) representados na Figura 6.2. (SPTB - Spectrin beta chain, erythrocytic - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt).

$\beta$  espectrina



**Figura 6.2** - Esquema representativo da localização na proteína  $\beta$ -espectrina dos principais domínios funcionais (A); na cadeia de aminoácidos (B) e no gene SPTB (C).

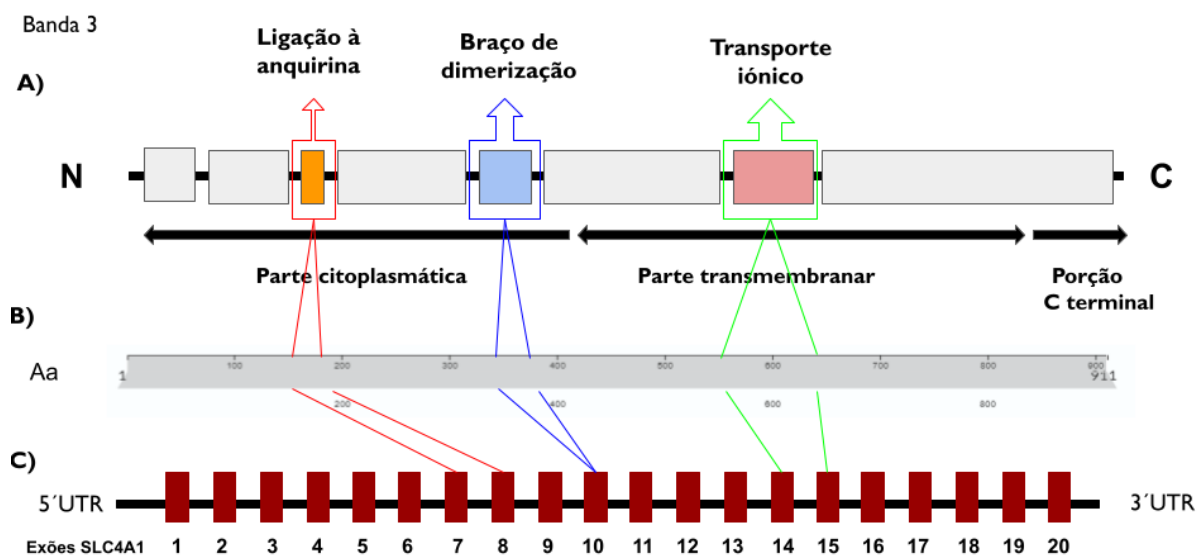
## Gene SLC4A1

O gene SLC4A1 (*solute carrier family 4 member 1*) no cromossoma 17 tem 20 exões e 4954 pares de bases. 19 exões codificam os 911 aa que formam a proteína de transporte de aniões banda 3 (NM\_000342.4) (Ensembl genome browser 109. (n.d.)). Esta é a maior proteína integral, constituindo aproximadamente 25% das proteínas totais da membrana e pode dividir-se em 3 partes funcionais (Figura 7):

- A porção hidrofílica citoplasmática (Aa 1 a 403) que se liga a outras proteínas periféricas para se ligar à espectrina (domínio de ligação à anquirina – Aa 176 a 185 e braço de dimerização - Aa 304 a 357);

- A porção hidrofóbica transmembranar (Aa 404 a 882) envolvida no transporte aniônico (CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup>);
- A porção C-terminal (Aa 883 a 911).

A proteína banda 3 existe na membrana como dímeros (60%) e tetrâmeros (40%) (SLC4A1 - Band 3 anion transport protein - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt).



**Figura 7** - Esquema representativo da localização na proteína Banda 3 dos principais domínios funcionais (A); na cadeia de aminoácidos (B) e no gene SLC4A1 (C).

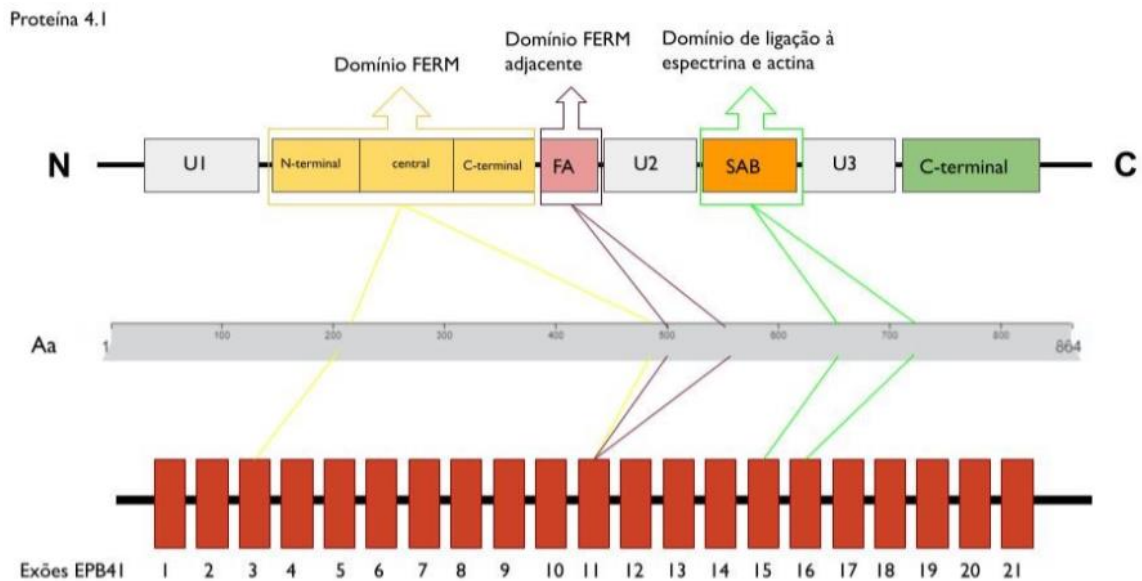
## Gene EPB41

O gene EPB41 (*Erythrocyte membrane protein band 4.1*) no cromossoma I tem 6031pb e 21 exões, dos quais 19 são codificantes (Ensembl genome browser 109. (n.d.)). A proteína 4.1 (NM\_001376013), codificada por este gene tem 864 aa e desempenha um papel fundamental na regulação das propriedades físicas da membrana em termos de estabilidade mecânica e deformabilidade, estabilizando a interação espectrina-actina. Podem-se distinguir quatro domínios principais nesta proteína (Figura 8):

- O Domínio FERM (Aa 210-491), que liga às proteínas membranares (banda 3, e outras);
- O domínio FERM adjacente (FA) (Aa 494-614), que é um substrato para fosforilação pela proteína quinase A e C;
- O domínio SAB (Aa 615-713), responsável pela ligação à actina-espectrina;

- O domínio C-terminal (CTD) (Aa 714-864) responsável pela ligação a outras proteínas membranares.

Entre os principais domínios estruturais encontram-se regiões relativamente conservadas entre as proteínas 4.1 (U1, U2 e U3) (EPB41 - Protein 4.1 - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt).



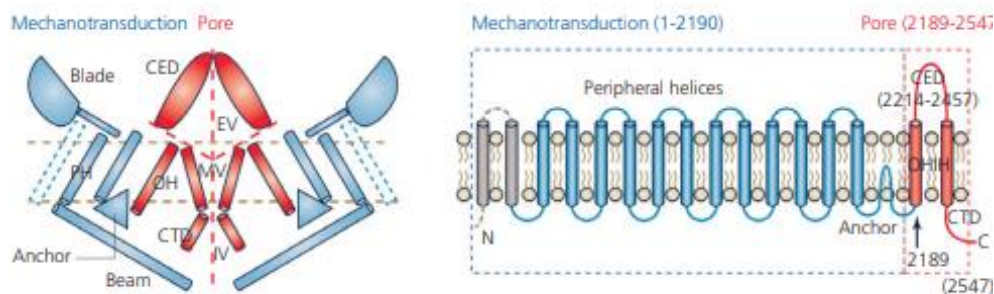
**Figura 8** - Esquema representativo da localização dos principais domínios funcionais na proteína 4.1 (A), na cadeia de aminoácidos (B) e no gene EPB41 (C).

## Gene PIEZO1

O gene PIEZO1 (*gene do componente 1 do canal iónico mecanossensível tipo Piezo*) no cromossoma 16 tem 51 exões e 8089 pares de bases (Ensembl genome browser 109. (n.d.)). Codifica um canal catiónico transmembranar não seletivo de 2521 aa chamado canal iónico mecanossensível do tipo piezoelétrico componente1 (NM\_001142864.4). Piezo vem do grego "*piesi*" que significa pressão, uma vez que esta proteína é responsável pela modificação da camada bilipídica em resposta ao stress e a um aumento da tensão da membrana, ajustando o volume dos eritrócitos e permitindo assim que atravessassem os microcapilares (Filser *et al.*, s.d.). A sua expressão é diminuída pela exposição de fosfatidilserina na superfície celular.

A proteína Piezo1 possui uma topologia única de 38 hélices transmembranares e componentes de mecanotransdução, que permitem um mecanismo de transporte mecânico tipo alavanca (Aa1-2190). A última hélice transmembranar envolve um poro hidrofóbico (Aa

2189-2547), seguido de três locais de fenestração intracelular e portais laterais que contêm resíduos determinantes da propriedade dos poros. A proteína tem 2 domínios; O domínio Piezo (Aa 1235-1465) e o domínio extracelular no terminal C, de ligação a R-Ras (*Piezo\_R-Ras-binding domain* ou FAM38) (Aa 2111-2519), que forma o poro (Figura 9) (PIEZO1 - Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1 - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt).



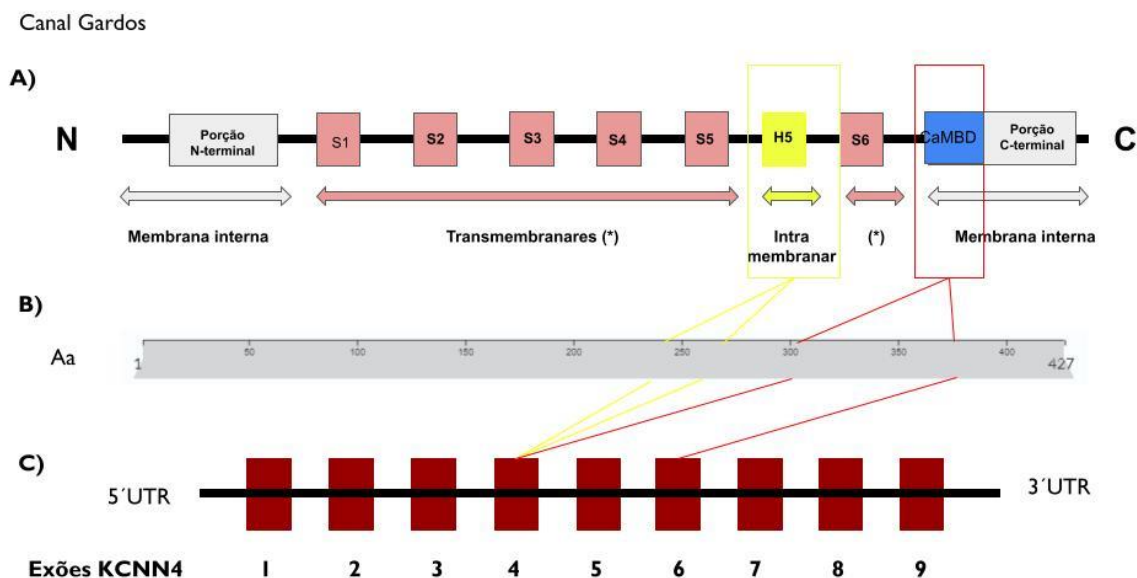
**Figura 9** - Ilustração dos módulos de mecanotransdução e poros do canal Piezo1 num modelo estrutural (esquerda) ou num modelo topológico (direita). Adaptado de Ge *et al.* (2015) e Zhao *et al.* (2016).

## Gene KCNN4

O gene KCNN4 (canal de potássio ativado por cálcio, subfamília N membro 4) está localizado no cromossoma 19. Com 9 exões e 1956 pares de bases, codifica a proteína de 427 aminoácidos canal Gardos (NM\_002250.3) (Ensembl genome browser 109. (n.d.)). O canal Gardos faz parte de um conjunto de pequenos canais de potássio activados por cálcio (*Small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels* ou *SK channels*), cujos terminais N e C da cadeia de peptídeos estão localizados na membrana interna do eritrócito. Esta família de canais é independente da carga e são ativados exclusivamente pelo Ca<sup>2+</sup> intracelular.

Em eritrócitos normais o canal Gardos está envolvido na regulação do volume celular e manutenção da homeostase, assegurando a manutenção da integridade e sobrevivência dos eritrócitos em diferentes condições, regulando o fluxo de iões de potássio em resposta a alterações nos níveis intracelulares de cálcio. O canal Gardos contém 6 domínios transmembranares helicoidais hidrófobos S1 a S6, uma região intramembranar hidrofóbica responsável pela formação do poro (H5) entre os domínios S5 e S6 (Aa 286-347), e um motivo perto do terminal C semelhante a um fecho de correr ligado à calmodulina que deteta a concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup> e a regula (Figura 10).

A proteína funcional é um complexo heteromérico composto pelas cadeias de peptídeos acima descritas e a calmodulina - proteína de ligação ao cálcio (caM) ligada através do domínio de ligação- *calcio membrane binding domain* (caMBD) (Aa 304-377).



**Figura 10** - Esquema representativo da localização no Canal Gardos dos principais domínios funcionais (A); na cadeia de aminoácidos (B) e no gene KCNN4 (C).

## Diagnóstico das Membranopatias

O diagnóstico diferencial entre as AH por défice da membrana eritrocitária é frequentemente muito difícil. De facto, a variedade de fenótipos inespecíficos e sobrepostos dificulta frequentemente uma gestão clínica correta dos doentes. O diagnóstico destas condições pode requerer várias linhas de investigação.

A primeira linha baseia-se em características clínicas (avaliação do hemograma completo), história familiar positiva e observação do esfregaço de sangue periférico. As diferentes membranopatias são diferenciadas pelas suas características morfológicas; por conseguinte, a avaliação morfológica dos eritrócitos ao microscópio é essencial. Uma anemia congénita com hemólise extravascular e com alterações morfológicas eritrocitárias características, mas não específicas, orientará o diagnóstico.

A segunda linha inclui testes bioquímicos e análises especializadas, incluindo o teste de crio-hemólise, teste de ligação eosina-5-maleimida (EMA) e, mais recentemente, ectacitometria de gradiente osmótico (Van Vuren *et al.*, 2019).



A última linha inclui a análise molecular do gene causador por sequenciação direta.

Infelizmente, em alguns casos, estas investigações ainda não conseguem chegar ao diagnóstico correto, especialmente quando a história familiar não é informativa ou quando os testes laboratoriais de rotina produzem dados pouco claros.

O diagnóstico no recém-nascido reveste-se de ainda maior dificuldade, devendo sempre ser descartadas outras causas mais frequentes de hemólise como incompatibilidade ou infecção.

### **Parâmetros bioquímicos**

Os parâmetros de normalidade e suas variações com idade, gênero e etnia devem ser mantidos em mente (Figura 11).

- Valores de Hb: Os valores de Hb são mais altos no recém-nascido, diminuem até ao 2º mês de vida e aumentam novamente gradualmente até à idade adulta. É mais elevado no sexo masculino e menor nas populações negras.

- Hematócrito: O número de eritrócitos circulantes, assim como os valores de Hb podem estar aumentados devido à altitude ou hábitos tabágicos.

- VCM (volume corpuscular médio): mede o tamanho dos eritrócitos, que pode encontrar-se aumentada em certos tipos de anemia, como anemia por deficiência de vitamina B12 ou ácido fólico, alcoolismo ou alterações na medula óssea. Se estiver diminuído, pode sugerir anemia por deficiência de ferro ou de origem genética, como a Talassemia, por exemplo.

- HCM (hemoglobina corpuscular média): indica a concentração total de hemoglobina através da análise do tamanho e coloração da hemácia. A HCM e o VCM são mais elevados nos recém-nascidos e estabilizam na idade adulta

- CHCM (concentração da hemoglobina corpuscular média): demonstra a concentração da hemoglobina por eritrócito.

- RDW (*red cell distribution width* ou o índice de variação do tamanho dos eritrócitos): é especialmente útil no diagnóstico diferencial de anemias hipocrômicas e microcíticas. Caso haja alteração pode ser indicativo de início de anemias por deficiência de ferro ou vitaminas, por exemplo.

- **Reticulócitos:** São um bom indicador da atividade medular.

Eritrócitos		Eritrograma		Valores de referência do recém-nascido	Valores de referência do bebé de 1 ano	Valores de referência da criança entre 2 e 12 anos
Hemácias	4.2 a 5.9 milhões/ $\mu$ L	Hemácias	3.9 a 5.4 milhões/ $\mu$ L	Eritrócitos	4.0 a 7 milhões/ $\mu$ L	4.1 a 5.1 milhões/ $\mu$ L
Hemoglobina	13.0 a 18.0 g/dL	Hemoglobina	12.0 a 16.0 g/dL	Hemoglobina	14 a 22 g/dL	11 a 14.1 g/dL
Hematócrito	38 a 52%	Hematócrito	35 a 47%	Hematócrito	45 a 77%	35 a 45%
VCM	80.0 a 100.0 fL	VCM	80.0 a 100.0 fL	VCM	92 a 120 fL	75 a 95 fL
HCM	27.0 a 32.0 pg	HCM	27.0 a 32.0 pg	HCM	31 a 37 pg	24 a 33 pg
CHCM	31.0 a 36.0 g/dL	CHCM	31.0 a 36.0 g/dL			
RDW	10 a 16%	RDW	10.0 a 16.0%			

**Figura II** - Valores de referência dos hemogramas no homem, na mulher e em crianças (Dean *et al.*, 2005)

## Teste de crio-hemólise (crioteste)

Este teste baseia-se no facto de os esferócitos apresentam hemólise aumentada quando incubados em soluções hipertónicas ao passar de 37 a 0°C. A presença de alterações nas proteínas de membrana dos GV torna-os mais suscetíveis à rutura pelo frio. Ao contrário de outros, este teste é independente da relação superfície/volume do eritrócito e não é específico para patologias de membrana, pois também pode ser positivo noutros tipos de anemia (autoimune, diseritropoiética, enzimopatias, etc.). É um método muito sensível mas pouco específico (Ciepiela *et al.*, 2018).

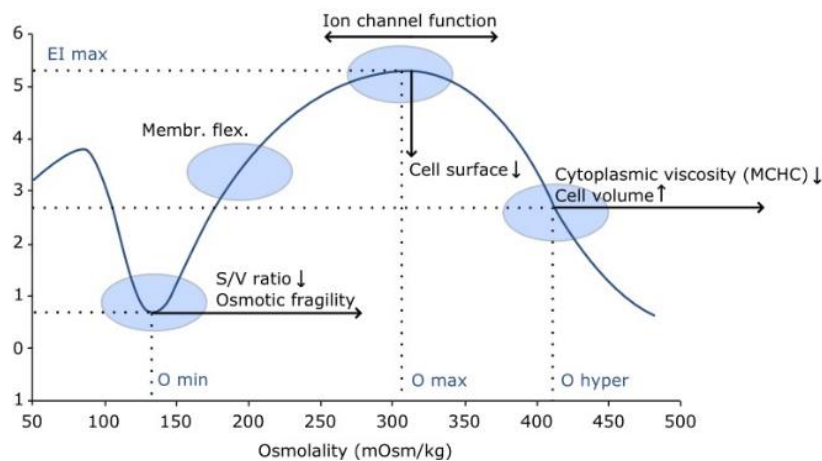
## Citometria de fluxo

Teste EMA (eosina-5-maleimida). Este teste baseia-se na marcação das membranas dos eritrócitos com a eosina-5-maleimida (EMA), um corante fluorescente que se liga covalentemente a um resíduo de lisina da banda 3. A afinidade para a proteína banda 3, permite a deteção dos eritrócitos deficientes nesta proteína por citometria de fluxo (CF) (Ciepiela *et al.*, 2018). Os esferócitos perdem a membrana por vesiculação e, com ela, a proteína banda 3, pelo que este teste fornece uma perspetiva sobre a perda funcional de membrana que existe em glóbulos vermelhos patológicos. Os resultados do teste EMA são apresentados como fluorescência média (MCF) em comparação com uma amostra de controlo - rácio MCF (MCF do doente/ MCF de controlo). Este teste apresenta alta sensibilidade (92%) e especificidade (99%) para o diagnóstico de esferocitose hereditária, independentemente de a variante patogénica afetar a banda 3, espectrina ou banda 4.2, embora seja menos sensível nas alterações da anquirina (Zaidi *et al.*, 2020).

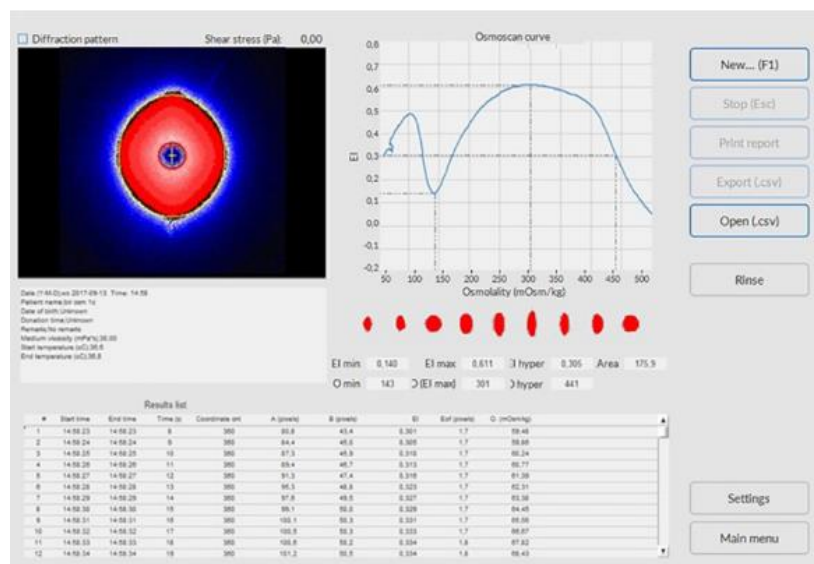
## Estudo da deformabilidade por ectaciometria

É a técnica de referência para avaliar a capacidade de deformação dos eritrócitos em gradiente osmótico, apesar da disponibilidade desta técnica nos laboratórios de rotina ser reduzida. Os eritrócitos passam de uma configuração discoide para uma configuração eliptocitária ao atravessarem os capilares e os microporos dos sinusóides esplenicos. Este fenómeno *in vivo* é reproduzido no ectacitómetro (Parrow *et al.*, 2018). As células são expostas a um gradiente osmótico crescente e a deformabilidade celular (mudança da forma discoide para a forma elíptica) é avaliada pelo modo como a luz se dispersa à medida que a célula responde às forças constantes de cisalhamento e ao gradiente osmótico (Figura 13). O resultado deste teste é um gráfico característico (osmoscan), que mostra a deformabilidade no eixo dos Y e a osmolalidade no eixo dos X (Figura 12). Este método permite a medição automática da deformabilidade do eritrócito (expressa como índice de alongamento, EI) como uma função contínua de suspensão da osmolalidade média (Da Costa *et al.*, 2016). Os osmoscans fornecem informações sobre a deformabilidade da célula, a sua viscosidade intracelular e relação superfície-volume (Figura 12). Para caracterização de cada osmoscan 4 parâmetros são definidos:

- Omin (a osmolalidade na EI mínima encontrada na região hipotónica): O Omin é o ponto em que os glóbulos vermelhos atingem o seu valor hemolítico crítico, devido à deslocação osmótica de água para o interior da célula num ambiente hipotónico; para além deste ponto, os glóbulos vermelhos, agora esferocíticos, sofrem lise com uma nova diminuição da osmolalidade.
- Elmáx (a EI máxima da curva total): O índice de deformabilidade máximo é o valor do índice na isotonicidade, e o ponto em que os glóbulos vermelhos atingiram a elipticidade máxima. O índice de deformabilidade reflecte a integridade e a elasticidade da membrana.
- Omax (a osmolalidade na EI-máx).
- Ohyper (a osmolalidade na região hipertónica correspondente a 50% da EI-max): O Ohyper é a osmolalidade em que o índice se situa a meio caminho entre a deformabilidade máxima e o Omin. O Ohyper está aumentado em estados de hidratação celular devido à diminuição da concentração de hemoglobina corpuscular média ou ao aumento líquido do teor de água (Version, -en. (n.d.). *Lorrca Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer*).



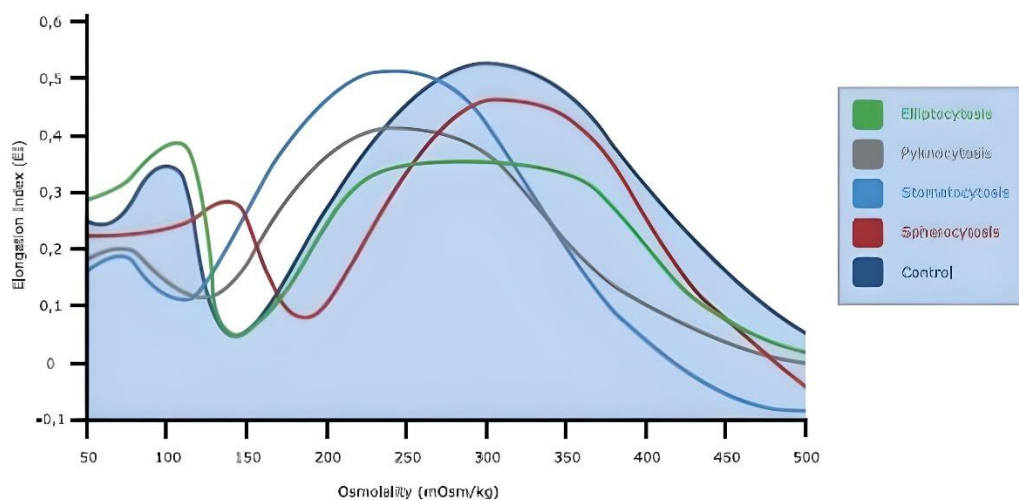
**Figura 12** - Módulo Osmoscam do *Laser-Assisted Optical Rotational Cell Analyzer* – LORRCA (Elmáx e Omáx refletem a deformabilidade; Elmin e Omin refletem a fragilidade osmótica e Elhyper e Ohyper refletem o estado de hidratação do GV).



**Figura 13** - Foto do módulo Osmoscam em funcionamento, com imagem da difração da luz à esquerda e osmoscam à direita.

Todas as esferocitoses hereditárias apresentam curvas de Osmoscam alteradas, com uma diminuição do Índice de Alongamento (Elmáx) e Omin deslocado para a direita. A eliptocitose hereditária apresenta uma curva trapezoidal e diminuição do Elmáx. A estomatocitose hereditária desidratada (DHS) causada por mutações no *PIEZO1* é caracterizada por uma curva deslocada para a esquerda, enquanto as mutações no *KCNN4* foram associadas a uma curva normal (Zaninoni *et al.*, 2018) (Figura 14). Na ovalocitose pode encontrar-se uma curva muito anormal com perfil achatado, na estomatocitose superhidratada

uma curva deslocada para a direita e na piropoiquilocitose uma curva trapezoidal muito anormal (Figura 14).



**Figura 14** - Aspeto das curvas padrão da ectacitometria para as principais patologias da membrana eritrocitária.

### Estudo molecular dos genes

O estudo dos genes que codificam as proteínas de membrana permite o diagnóstico de certeza em uma membranopatia. A sequenciação do(s) gene(s) pela técnica tradicional (Sanger) permite confirmar o diagnóstico, mas pode ser complexa devido ao número e tamanho dos genes suspeitos. Atualmente, trabalhando com painéis (orientados para doenças) que contém múltiplos genes e num único procedimento (sequenciação de próxima geração-NGS) todos os genes do painel são analisados, o que permite um diagnóstico molecular mais rápido e barato. O diagnóstico molecular é essencial em pacientes em que os testes tradicionais são duvidosos, em pacientes dependentes de transfusões ou em situações mais raras e/ou complexas como a anemia hemolítica em recém-nascidos (Raos *et al.*, 2022). A utilização de NGS tem a vantagem de permitir uma gestão e vigilância adequadas das características da doença com base no gene envolvido e a severidade fenotípica a que está associado, especialmente se a esplenectomia for uma consideração. Permite também testes preditivos e melhor aconselhamento genético.

### Classificação de variantes

O grande desenvolvimento da biologia molecular das últimas décadas e o aumento massivo e rápido de geração de dados de análise genética trouxe consigo a necessidade de

organizar e classificar de modo eficaz e reprodutível as variantes encontradas. Um dos sistemas mais conhecidos de classificação de variantes é o *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)*, que foi atualizado em 2015 com a publicação do artigo “*Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*”. O sistema ACMG é baseado numa abordagem de evidência hierárquica, que leva em consideração diversos critérios, incluindo dados populacionais (MAF- minor allele frequency), dados computacionais (ferramentas *in silico*), estudos funcionais (fenótipo e estudos *in vitro*) e estudos familiares (segregação) (Richards *et al.*, 2015).

O sistema ACMG classifica as variantes em cinco categorias: 5- Patogénica, 4- Provavelmente patogénica, 3- Variante de significado indeterminado (VUS), 2- Provavelmente benigna e 1- Benigna.

Outros guidelines para classificação de variantes incluem o sistema de classificação de variantes do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* e o sistema de classificação de variantes do *European Molecular Biology Laboratory (EMBL)*.

É importante lembrar que a classificação de variantes genéticas é um processo contínuo e dinâmico, que pode mudar à medida que novas informações se tornam disponíveis. Este é o grande desafio da bioinformática, conseguir um armazenamento e gestão eficientes de grandes quantidades de dados, conseguir integrar a grande complexidade, diversidade e heterogeneidade desses dados biológicos, e ainda fazê-lo rapidamente.

Hoje em dia existem inúmeras bases de dados que centralizam todos os tipos de informação disponível. Bases de dados de sequências nucleotídicas (GenBank – NCBI, Ensembl – EMBL e outros), de proteínas (UniProt, Prosite, NCBI, PDB-protein data bank e outras), de correlação genótipo/fenótipo (Orphanet, ClinGen, OMIM), bases de dados Locus específicas (ClinVar, HGMD- Human Gene Mutation Database), bases de dados específicas de patologias e variantes associadas (Lthanet, EAHAD, RetinalInternational, entre outras) e bases de dados populacionais (GnomAD, 1000Genomes).

Na rotina laboratorial em biologia molecular utilizam-se ferramentas *in silico* para ajudar de forma mais rápida a classificar as variantes suspeitas encontradas. A análise *in silico* de variantes é um processo computacional que utiliza algoritmos e as bases de dados para prever o efeito de uma variante genética numa proteína. Existem várias ferramentas *in silico*

disponíveis, cada uma com as suas características, os seus algoritmos e bases de dados. Estas ferramentas permitem que o utilizador selecione quais os critérios de patogenicidade que devem ser considerados (como a conservação evolutiva do resíduo, a localização da variante no gene, a alteração prevista na proteína, entre outros) e ajustar os parâmetros de análise de acordo com necessidades específicas (ajustar o limiar de pontuação para determinar a patogenicidade de uma variante).

A ACMG recomenda ainda que a descrição do processo de classificação das variantes seja efetuada em três categorias: I) com base em critérios que utilizam tipos típicos de evidência para variantes (por exemplo, dados populacionais, dados computacionais, dados funcionais); II) interpretação dos resultados por um laboratório certificado e III) geneticista molecular clínico certificado ou patologista de genética molecular ou equivalente.

## Objetivos

Com este trabalho pretende-se:

Fazer a caracterização molecular num grupo de doentes com anemia hemolítica crónica por patologia da membrana eritrocitária usando um painel de NGS.

Fazer uma correlação entre os resultados do estudo molecular, nomeadamente o gene mutado e a localização da variante patogénica, e os estudos funcionais.

Validar a ectacitometria como método preciso e sensível de diagnóstico, avaliar a sua utilidade como método de diagnóstico diferencial das membranopatias e estabelecer a relação genótipo-fenótipo nestas doenças.



## **Materiais e Métodos**

### **Amostragem**

Um total de 45 doentes com anemia hemolítica crónica e suspeita de patologia hereditária da membrana dos eritrócitos (com anemia autoimune previamente excluída) foram selecionados na Unidade de Eritropatologia e Metabolismo do Ferro da Unidade Funcional de Hematologia Clínica-CHUC. A Unidade de Eritropatologia integra a rede de referência europeia de hematologia para doenças raras do eritrócito ERN- *EuroBloodNet*- sendo centro de referência.

Sempre que possível foi feito e observado o esfregaço de sangue periférico (ESP) e realizados os testes funcionais de criohemólise e ectacitometria. O teste EMA não é realizado no nosso laboratório mas os resultados disponíveis foram integrados neste estudo.

Em todas as amostras foi feita extração de DNA e estudo molecular por painel de NGS.

O DNA extraído a partir do sangue periférico em EDTA, foi analisado utilizando um painel de sequenciação de nova geração para anemias hemolíticas desenhado no nosso laboratório e posteriormente feita a análise bioinformática. As variantes encontradas no NGS foram confirmadas por sequenciação Sanger e, quando possível, investigadas nos familiares. Os principais polimorfismos de baixa expressão do gene SPTAI (Lely, Lepra e Prague) foram também investigados por sequenciação de Sanger, uma vez que não estão cobertos pelo NGS.

### **Estudos funcionais**

#### **Crioteste**

O teste de crio-hemólise foi realizado num máximo de 48 horas após a colheita de sangue total em EDTA. Partindo de 1 ml de sangue foram realizados os procedimentos segundo o *Practical Hematology* (Practical Hematology; Tenth Edition; 2006, S M Lewis, B J Bain, I Bates; Churchill Livingstone) e descritos na Tabela Suplementar 3. Após as leituras das absorvâncias, um cálculo da percentagem de criohemólise >20% é sugestivo de esferocitose hereditária

## **Ectacitometria de gradiente osmótico (curva Osmoscan)**

Duzentos microlitros de amostra de sangue total em EDTA suspensa em 5 ml de tampão de polivinilpirrolidona foram utilizados para a análise. O osmoscan foi efetuado utilizando o Laser-assisted Optical Rotation Cell Analyzer (LoRRca MaxSis, Mechatronics, Hoorn, The Netherlands) de acordo com as instruções do fabricante e conforme relatado em pormenor por alguns autores (Da Costa *et al.*, 2013, 2016) (Version, n.d.). As curvas de gradiente osmótico refletem a deformabilidade dos eritrócitos como uma função contínua da osmolalidade do meio de suspensão. Foram avaliados os seguintes parâmetros: Omin, Elmáx, Omáx e Ohyper.

## **Caracterização molecular**

### **Extração**

O DNA genómico foi extraído do sangue total recolhido em tubos contendo EDTA, por isolamento automático com o kit de extracção de ADN QIASymphony® (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante (QIASymphony SP/AS Instruments, n.d.).

### **Sequenciação de Sanger**

A sequenciação de Sanger foi efetuada para confirmar as variantes patogénicas ou de significado indeterminado encontradas no NGS. O primeiro passo realizado foi a reação de PCR, previamente otimizada no laboratório de modo a conseguir obter um número elevado de cópias dos fragmentos das regiões específicas dos genes, e deste modo obter uma quantidade suficiente de DNA para a sequenciação. Os primers específicos utilizados neste estudo, previamente descritos na literatura ou desenhados na Unidade Funcional de Hematologia Molecular (CHUC), encontram-se detalhados na Tabela suplementar 5. Para cada gene foram feitas as reações de PCR necessárias utilizando sempre 100 ng/μl de DNA. O termociclador utilizado nas reações de PCR foi o BioRad C1000™ Thermal Cycler (*The Bio-Rad Literature Library | Bio-Rad*, n.d.) e os reagentes foram da QIAGEN®.

A amplificação do DNA por PCR foi confirmada por eletroforese num gel de agarose a 2%. Este gel foi preparado com 1g de agarose misturada em 50 mL de TBE 0,5% (Tris 1,78 M; EDTA 0,04 M; Ácido Bórico 1,77 M). A solução foi aquecida até que a agarose estivesse completamente dissolvida e, em seguida, foram adicionados 4 μL de corante SYBR™ Safe. 4μl

de cada amostra de produto de PCR foram carregados, misturados com uma gota de corante para aumentar o peso molecular. Por fim, o gel foi corrido a 120 V durante 30 minutos e os fragmentos de DNA amplificados visualizados com luz UV e fotografados.

A sequenciação de Sanger foi feita utilizando uma técnica de 3 passos:

I) purificação EXOSAP<sup>®</sup>, II) reação de sequenciação; III) purificação em coluna de resina.

Após a purificação enzimática com EXOSAP<sup>®</sup> (fosfatase alcalina) dos produtos de PCR, estes foram submetidos a reacções de sequenciação utilizando o *kit* BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycler Sequencing (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) e primers personalizados para sequenciar a região de interesse. Depois disso, o BigDye<sup>®</sup> não incorporado foi eliminado aplicando a amostra de sequenciação numa coluna de resina. Finalmente, o produto recolhido foi carregado numa placa de sequenciação e analisado no sequenciador Applied Biosystems<sup>™</sup> SeqStudio<sup>™</sup> Genetic Analyzer conforme instruções do fabricante (MicroSEQ<sup>™</sup> ID Software para SeqStudio<sup>™</sup> Genetic Analyzer v1.0, s.d.). As sequências obtidas foram lidas com o software Chromas versão 2.6.6 (*Chromas | Technelysium Pty Ltd*), e alinhadas com o Clustal Omega-EMBLEB (*Clustal Omega < Multiple Sequence Alignment < EMBL-EBI*). A sequência de referência para o alinhamento foi obtida da base de dados online Ensembl Genome - EMBL-EBI GRCh38.p13 (*Ensembl Genome Browser 109*).

### **Estudos moleculares por painel de NGS**

Para identificar as variantes causais nos doentes com patologia de membrana do GV utilizou-se um painel de NGS desenhado na Unidade Funcional de Hematologia Clínica para anemias hemolíticas. Este painel inclui os exões, as regiões promotoras e as regiões flanqueadoras intrónicas dos genes previamente descritos como associados a anemias hemolíticas. O painel é composto pelos genes HBA1, HBA2, HBB e KLF1 para as hemoglobinopatias; os genes ALDOA, AKI, G6PD, GPI, PKLR, HKI, NT5C3A, TPII, PGKI, PFKM, GPX1, GSR e GSS para as enzimopatias; os genes ANK1, SLC4A1, EPB41, EPB42, SPTA1, SPTB, GYPC, PIEZO1, KCNN4 e RHAG para as membranopatias; os genes ABCB7, HSPA9, SLC25A38, ALAS2 e GLRX5 para a anemia sideroblástica congénita e os genes C15ORF41, CDANI, SEC28B e KIF23 para a anemia desieritropoietica congénita.

Todas as amostras de DNA foram previamente quantificadas por fluorometria com o Qubit<sup>®</sup> segundo instruções do fabricante e diluídas para 4ng/μl.

As bibliotecas de sequenciação foram preparadas utilizando o AmpliSeq Library Kit 2.0 (*Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0*, n.d.) e as bibliotecas com código de barras (*barcode*) agrupadas foram amplificadas clonalmente pelo Ion OneTouch2, seguindo o protocolo do fabricante (*Ion OneTouch™ 2 System*, n.d.). As partículas enriquecidas positivas para o modelo foram carregadas num chip Ion 316 ou 318 e sequenciadas utilizando a reação do Ion Hi-Q Sequencing 200 *Kit* num sistema de sequenciação Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific).

Os resultados do NGS foram analisados com o Ion Torrent Suite™ (v3.6; Thermo Fisher Scientific) e com o T-MAP (versão 3.6.58977) para alinhar as sequências com o genoma humano versão 38 (GRCh38). As variantes foram identificadas utilizando o Torrent Variant Caller, com as definições Germ Line - Low Stringency (versão 3.6.59049). Estas foram anotadas utilizando o Ion Reporter™ (Thermo Fisher Scientific). A profundidade mínima de cobertura necessária para que cada nucleótido na região de interesse (ROI) fosse identificado/considerado uma variante candidata foi  $\geq 100\times$ . A cobertura média foi altamente variável; no entanto, a média para todas as ROIs foi de pelo menos 500 vezes em todos os doentes.

### **Análise bioinformática**

Para analisar os resultados obtidos no NGS, o critério utilizado foi a inclusão de variantes com  $MAF \leq 0,01$  e cobertura  $> 100$ . Todas as variantes que resultaram destes filtros foram pesquisadas nas bases de dados Human Gene Mutation Database (HGMD) e ClinVar. As novas variantes (variantes não descritas na literatura) foram analisadas utilizando as plataformas digitais Varsome e Franklin para classificar a sua patogenicidade e os resultados foram agrupados em Variantes Benignas, Provavelmente benignas, Variantes de significado indeterminado (VUS), Provavelmente patogénicas e Patogénicas.

## Resultados

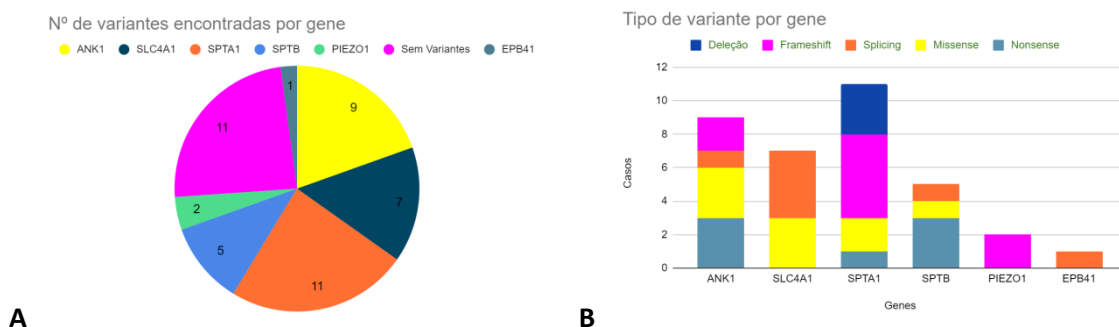
Neste estudo foram processadas 45 amostras de doentes com anemia hemolítica crónica e suspeita de patologia hereditária da membrana dos eritrócitos. O espectro de idades dos doentes é amplo, variando de 14 dias a 77 anos. 16 doentes têm menos de 3 anos de idade. Ambos os géneros estão representados (18 mulheres e 27 homens). A maioria das amostras chegaram ao nosso laboratório com informação clínica de suspeita de esferocitose, com ou sem história familiar, sendo algumas pós-transfusão, conforme descrito na Tabela 3.

**Tabela 3** - Caracterização das 45 amostras em estudo.

Género	Nº de amostras	Idade no diagnóstico (anos) (média)	Hb média (g/dl)	Reticulócitos (%)	Suspeita de EH	Suspeita de Elip H	Suspeita de Xerocitose	História familiar positiva	Transfundidos
Homens	27	26 (0-77)	11.6 (5.2-15.8)	6.31 (0.3-13.32)	10	2	0	2	3
Mulheres	18	23 (0-63)	10.6 (6.6-13.6)	5.6 (1.32-9.9)	8	0	1	5	2
Total	45				18	2	1	7	5

A observação do ESP e estudos funcionais de patologia da membrana (crioteste, ectacitometria e EMA) nos doentes não transfundidos, permitiu separá-los em provável esferocitose hereditária, eliptocitose hereditária ou xerocitose hereditária.

No estudo por NGS das 45 amostras foi possível encontrar variantes que justificam o fenótipo em mais de 75% dos casos. Em 11 casos não se identificaram variantes patogénicas. As 35 variantes encontradas estão distribuídas por 6 dos genes descritos em associação com patologia de membrana do eritrócito: 9 variantes no *ANK1*, 7 no *SLC4A1*, 11 no *SPTA1*, 5 no *SPTB*, 2 no *PIEZO1* e 1 no gene *EPB41* (Figura 15-A). O tipo de variantes encontradas é heterogéneo, mesmo dentro do mesmo gene, tendo-se encontrado variantes de *splicing*, *frameshifts*, *missense*, *nonsense* e grandes deleções (Figura 15-B).



**Figura 15 - A** - Gráfico do número de variantes encontradas no *ANK1*, *SLC4A1*, *SPTA1*, *SPTB*, *PIEZO1* e *EPB41*. **B** - Gráfico do tipo de variantes encontradas em cada gene.

Para sistematização e melhor análise dos resultados moleculares obtidos, estes foram agrupados em 6 grupos: **Grupo I** - Amostras com variantes no *ANK1*, **Grupo II** - Amostras com variantes no *SPTB*, **Grupo III** - Amostras com variantes no *SLC4A1*, **Grupo IV** - Amostras com variantes no *SPTA1*, **Grupo V** - Amostras com variantes no *PIEZO1* e **Grupo VI** - Amostra com variante no *EPB41* (Tabela 4).

**Tabela 4** - Caracterização das variantes encontradas nas 45 amostras agrupadas pelo gene em que se localizam.

GRUPO I – Amostras com variantes no <i>ANK1</i>					
Caso	Variante(s)	Tipo de variante	Zigotia	Análise <i>In silico</i>	Referência
1	ANK1:c.2920_2921insGGCCTCGCCAGCA-p.Ile975Alafs*7 (exão 26)	Frameshift	Heterozigotia	Provavelmente Patogénica	Não descrita
3	ANK1: c.3928del p.Gln1310Serfs*18 (exão 32)	Frameshift	Heterozigotia	Provavelmente Patogénica	Não descrita
4	ANK1: c.1801-17G>A (Intrão16)	Splicing	Heterozigoti	Patogénica	Kang LL et al 2007
8	ANK1: c.2637+1G>T (intrão24)	Splicing	Heterozigotia	Provavelmente Patogénica	Não descrita
19	ANK1: c.1105_1106insC p.Leu369Profs*102 (exão 10)	Frameshift	Heterozigotia	Provavelmente Patogénica	Não descrita
36	ANK1: c.2467G>T p.Glu823* (exão 23)	Nonsense	Heterozigotia	Provavelmente Patogénica	Não descrita
38	ANK1: c.253G>A p.Ala85Thr (exão 23)	Missense	Heterozigotia	VUS	Não descrita
42	ANK1: c.3694G>T p.Glu1232* (exão 31)	Nonsense	Heterozigotia	Provavelmente Patogénica	Não descrita
43	ANK1: c.253G>A p.Ala85Thr (exão 4)	Missense	Heterozigotia	VUS	Svidnicki et al 2020

GRUPO II – Amostras com variantes no SPTB					
Caso	Variante(s)	Tipo de variante	Zigotia	Análise <i>In silico</i>	Referência
6	SPTB: c.1264C>T p.Gln422* (exão 11)	Nonsense	Heterozigotia	Patogénica	Não descrita
7	SPTB: c.4942C>T p.Gln1648* (exão 24)	Nonsense	Heterozigotia	Patogénica	Não descrita
30	SPTB: c.6023-6del (intrão 29)	Consensus Splicing	Heterozigotia	VUS	Não descrita
32	SPTB: c.5635C>T p.Gln1879* (exão 27)	Nonsense	Heterozigotia	Provavelmente Patogénica	Não descrita
34	SPTB: c.154C>T p.Arg52Trp (exão 3)	Missense	Heterozigotia	Patogénica	Fermo et al 2021

GRUPO III – Amostras com variantes no SLC4A1					
Caso	Variante(s)	Tipo de variante	Zigotia	Análise <i>In silico</i>	Referência
2	SLC4A1: c.106+1G>A (intrão 3)	Splicing	Heterozigotia	Patogénica	Von Kanel et al., 2013
10	SLC4A1: c.733G>A p.Val245Met (exão 9)	Missense	Heterozigotia	VUS	Não descrita
14	SLC4A1: c.1462G>A p.Val488Met (exão 13)	Missense	Heterozigotia	Patogénica	Tote et al 2020
24	SLC4A1: c.1626+1G>A (intrão 13)	Splicing	Heterozigotia	Provavelmente patogénica	Não descrita
25	SLC4A1: c.1318C>G p.Leu440Val (exão 12)	Missense	Heterozigotia	VUS	Não descrita
31	SLC4A1: c.607_609+5del (intrão 7)	Splicing	Heterozigotia	Provavelmente patogénica	Não descrita
40	SLC4A1: c.1890+1G>A (intrão 15)	Splicing	Heterozigotia	Patogénica	Não descrita

GRUPO IV- Amostras com variantes no SPTA1							
Caso	Variante	Tipo de variante	Zigotia	$\alpha$ -Lely	$\alpha$ -Lepra	Análise <i>in silico</i>	Referência
5	SPTA1: c.6454C>T p.Gln2152* (exão 45)	Nonsense	Heterozigotia	Sim - heterozigotia	Não	Provavelmente patogénica	Não descrita
9	SPTA1: c.4110del p.Gln1371Lysfs*5 (exão 29)	Frameshift	Heterozigotia	Sim - heterozigotia	Sim - heterozigotia	Provavelmente patogénica	Svidnicki et al., 2020
11	SPTA1: c.4110del p.Gln1371Lysfs*5 (exão 29)	Frameshift	Heterozigotia	Sim - homozigotia	Não	Provavelmente patogénica	Svidnicki et al., 2020
12	SPTA1: c.4110del p.Gln1371Lysfs*5 (exão 29)	Frameshift	Heterozigotia	Sim - homozigotia	Não	Provavelmente patogénica	Svidnicki et al., 2020
16	Grande deleção SPTA1		Heterozigotia	Sim - homozigotia	Não	Descrita	Vives-corons, 2022 Chonat, 2019
17	Grande deleção SPTA1		Heterozigotia	Não	Sim - homozigotia	Descrita	
26	Grande deleção SPTA1		Heterozigotia	Sim - homozigotia	Não	Descrita	

33	SPTA1: c.4110del p.Gln1371Lysfs*5 (exão 29)	Frameshift	Hetero- zigotia	Sim - homozigotia	Não	Provavelmente patogénica	Svidnicki <i>et al.</i> , 2020
39	SPTA1: c.4784G>C p.Arg1595Thr (exão 34)	missense	Hétero- zigotia	Não	Não	VUS	Não descrita
	SPTA1: c.6421C>T p.Arg2141Trp (exão 45)	missense	Hétero- zigotia			Patogénica	Niss <i>et al</i> 2016

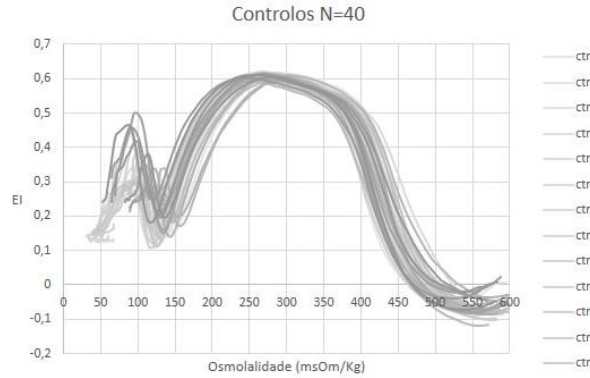
GRUPO V – Amostras com variantes no <i>PIEZO1</i>					
Caso	Variante(s)	Tipo de variante	Zigotia	Análise In silico	Referência
37	PIEZO1: c.7483_7488dup p.Leu2495_Glu2496dup (exão 51)	Frameshift	Heterozigotia	Patogénica	More TA <i>et al</i>
41	PIEZO1: c.7483_7488dup p.Leu2495_Glu2496dup (exão 51)	Frameshift	Heterozigotia	Patogénica	More TA <i>et al</i>

GRUPO VI – Amostra com variante no <i>EPB41</i>					
Caso	Variante(s)	Tipo de variante	Zigotia	Análise In silico	Referência
45	EPB41 :c.1365+1G>T (intraão 9)	Splicing	Heterozigotia	Provavelmente patogénica	Não descrita

Identificaram-se neste estudo 19 variantes classificadas como patogénicas ou provavelmente patogénicas ainda não descritas.

Os gráficos de ectacitometria obtidos foram também agrupados pelo gene em que se identificou a/as variante/s patogénica/s (Figura 17) e os valores dos pontos analisados (Elmáx, Omáx, Omin e Ohyper) sistematizados na Tabela 5, onde se consegue fazer a comparação com os valores médios dos 40 controlos normais utilizados (Figura 16).

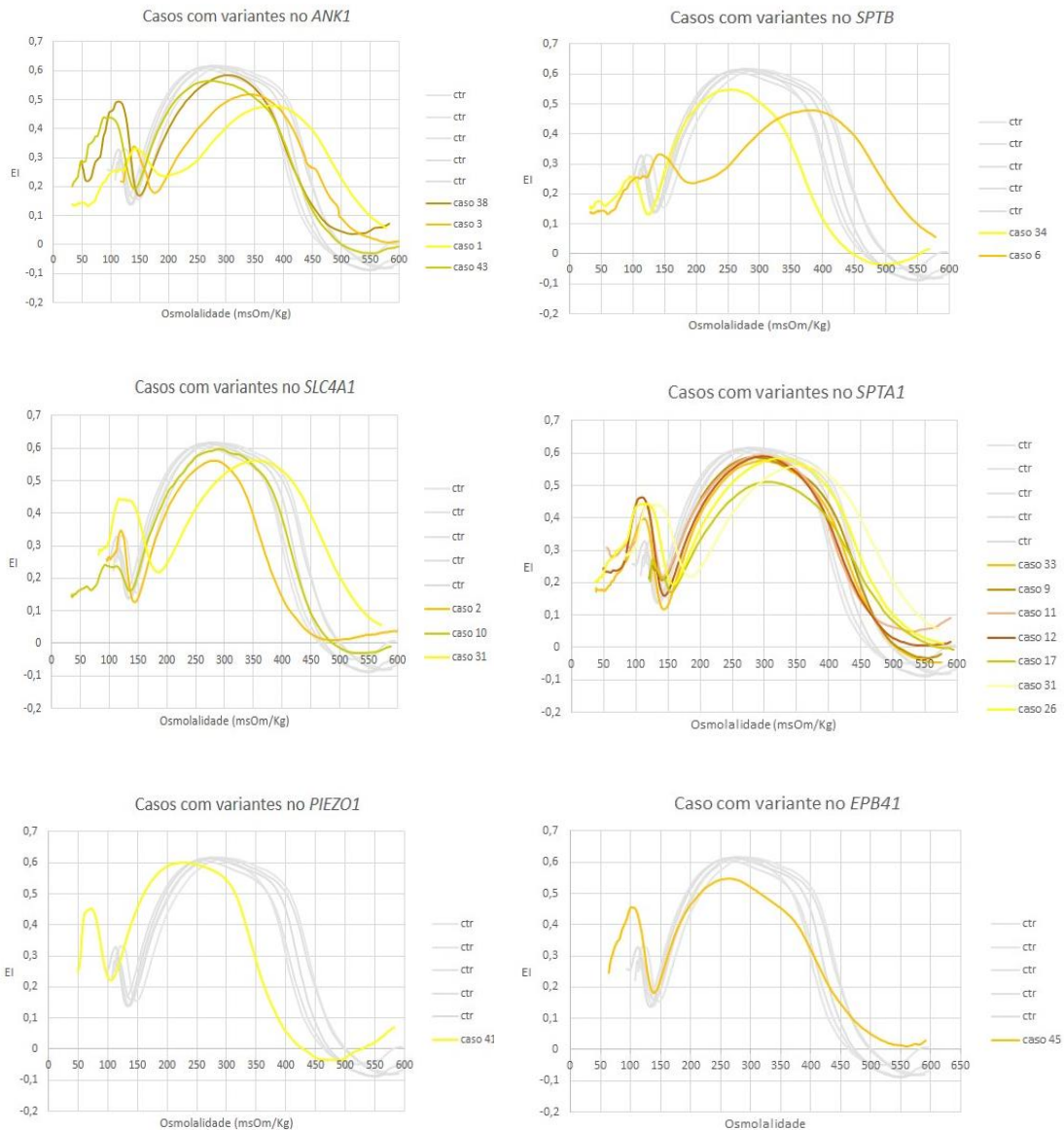




**Figura 16** - Osmoscans dos 40 controlos normais.

**Tabela 5** - Valores médios de Omin, Omáx, Elmáx e Ohyper para os 40 controlos normais utilizados no estudo e valores absolutos para cada amostra estudada por ectacitometria (**bold** - valores aumentados e **bold** - valores diminuídos em relação aos controlos).

	Omin (mOsm/Kg)	Omáx (mOsm/Kg)	Elmáx	Ohyper (mOsm/Kg)
<b>Controlos (N=40)</b>	<b>132.19±0.01 (113.9-162)</b>	<b>270.54±0.01 (222.05-329.19)</b>	<b>0.607±0.001 (0.589-0.619)</b>	<b>411.48±0.01 (361.15-454.44)</b>
Caso 1	193.71	383.34	0.479	497.69
Caso 2	142.98	279.21	0.560	395
Caso 3	176.65	342.24	0.519	557.57
Caso 5	153.29	306.94	0.600	425.82
Caso 6	193.71	388.99	0.479	497.38
Caso 9	139.60	281.24	0.587	417.11
Caso 10	137.69	292.43	0.596	405.67
Caso 11	142.59	302.85	0.565	434.56
Caso 12	144.37	301.39	0.590	439.82
Caso 16	160.86	338.76	0.589	459.63
Caso 17	155.28	304.73	0.513	446.12
Caso 26	156.81	324.68	0.583	452.52
Caso 31	186.92	360.97	0.561	478.33
Caso 33	143.04	292.4	0.576	417.61
Caso 34	54.46	254.43	0.548	367.62
Caso 38	150.98	304.91	0.584	412.13
Caso 41	105.97	223.54	0.599	346.68
Caso 43	141.81	267.62	0.566	410.67
Caso 45	138.79	266.55	0.549	412.13



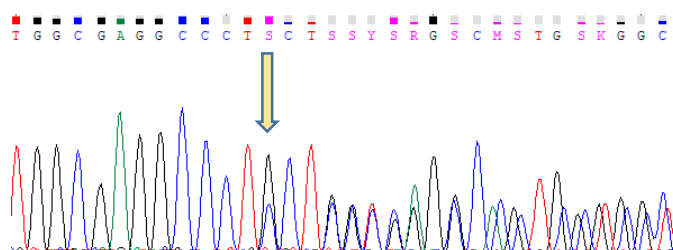
**Figura 17** - Gráficos de ectacitometria agrupados por gene em que se encontrou a variante patogénica.

### **Grupo I – Amostras com variantes no gene ANKI**

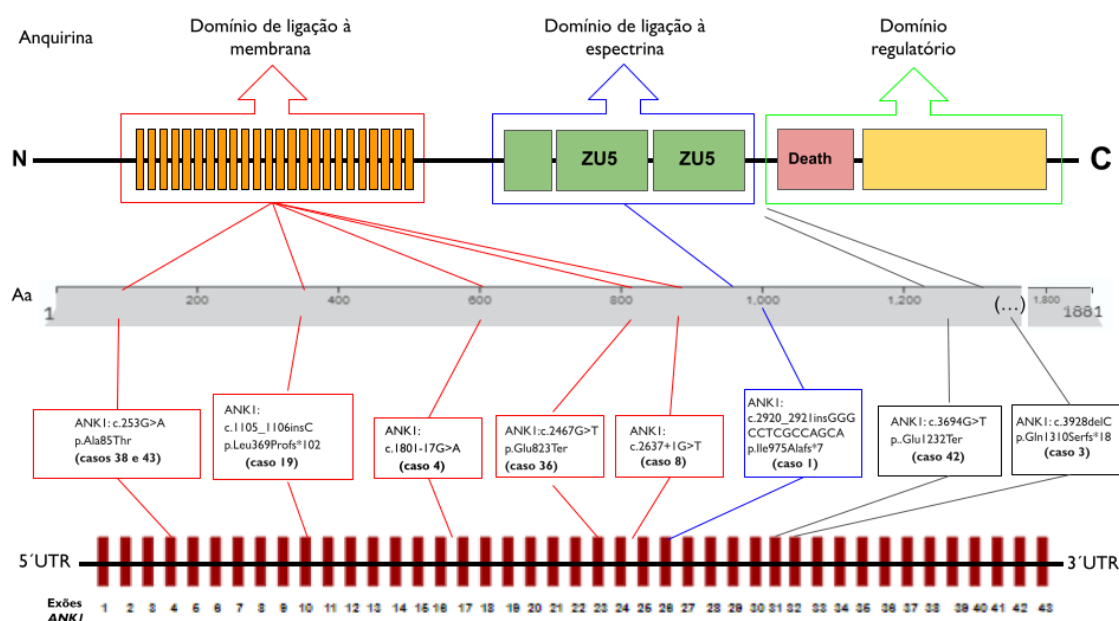
Foram identificadas variantes no gene ANKI em 9 casos. O tipo de variantes encontradas, assim como a sua localização na proteína foram representados na Figura 19. Os resultados laboratoriais estão agrupados na Tabela 6. As variantes identificadas foram confirmadas por sequenciação de Sanger. Os estudos familiares no caso I foram negativos.

**Tabela 6** - Casos com variantes identificadas no ANK 1, idades, género, parâmetros bioquímicos e estudos funcionais (Retic% - percentagem de reticulócitos, Bilir. Total- Bilirrubina total)

Caso	Idade	Género	Hb (g/dl)	VCM (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Retic %	Bilir. total (mg/dl)	Ferritina (mg/dl)	EMA	Ectacitometria	Crioteste
1	3 meses	M	5,2	80,6	24,6	30,6	12,80%	5,37	233	0,84	Sugestivo de EH	Positivo
3	40 anos	M	15,8	85,2	31,2	36,6	3,90%	0,8	264,51	0,76	Sugestivo de EH	Positivo
4	39 anos	F	9,7	87	29,6	34	8%	5,7	319	0,76		Positivo
8	23 anos	F	13,6	86,6	31,5	36,4	3,50%	0,9	64,13	0,73		Positivo
19	4 meses	M										
36	2 anos	F	11,4	80,7	29,8	36,9	5,5%	0,7	11404	0,7		Positivo
38	64 anos	F									Sugestivo de EH	
42	36 dias	F										



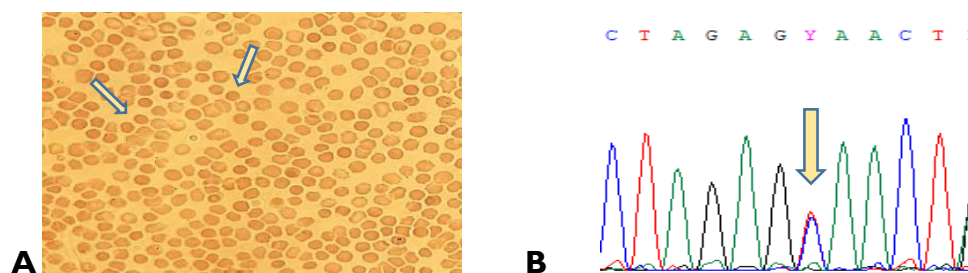
**Figura 18** - Variante ANK1: c.2920\_2921insGGGCCTCGCCAGCA identificada no caso 1 em heterozigotia por sequenciação de Sanger.



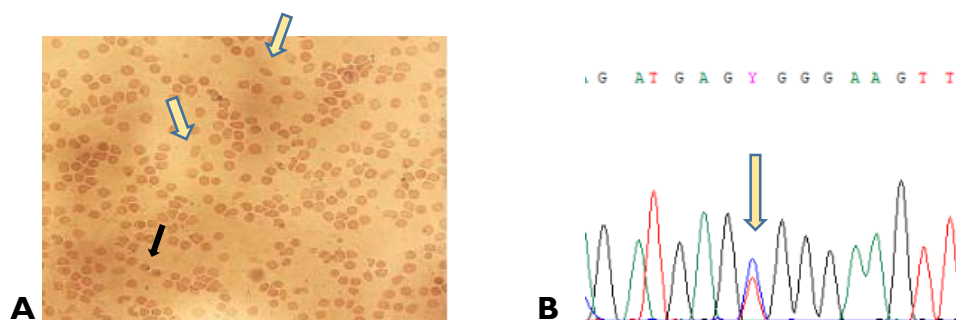
**Figura 19** - Esquematização da localização na proteína anquirina das variantes encontradas no ANK1; na cadeia de aminoácidos (Aa) e no gene (Exões ANK1). As variantes encontradas nos casos 38, 43, 19, 4, 38 e 8 localizam-se no domínio de ligação à membrana; a variante encontrada no caso 1 localiza-se no domínio de ligação à espectrina; e as variantes encontradas nos casos 42 e 3 encontram-se antes do domínio regulatório da anquirina.

## GRUPO II – Amostras com variantes no gene SPTB

Identificaram-se 5 variantes diferentes no *SPTB* em 5 amostras. Três do tipo *nonsense*, 1 *missense* e 1 de *splicing*, que se prevê afetarem diferentes domínios funcionais da  $\beta$ -espectrina representados na Figura 22. Os resultados laboratoriais foram agrupados na Tabela 7. No caso 6 e 34 fizeram-se estudos familiares. A variante encontrada no caso 6, SPTB: c.1264C>T foi identificada por sequenciação de Sanger em heterozigotia na mãe (Figura 20-B). A variante encontrada no caso 34, SPTB: c.154C>T foi identificada por sequenciação de Sanger em heterozigotia na mãe (Figura 21-B).



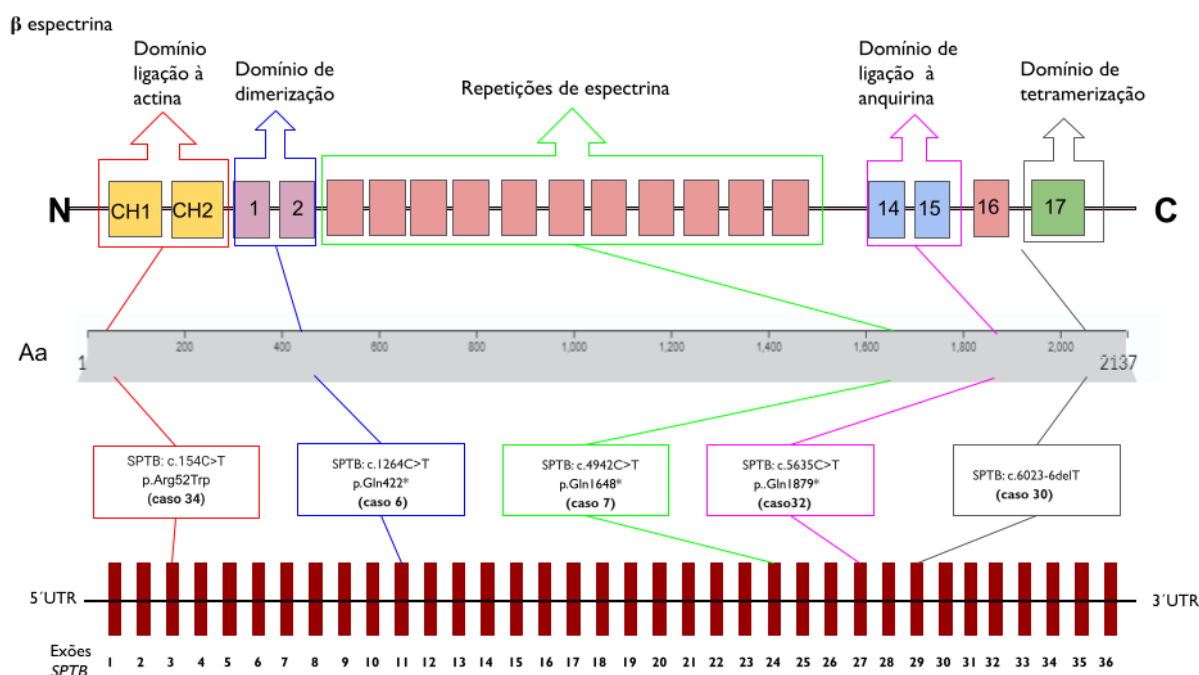
**Figura 20** - A - ESP do caso 6 com alguns esferócitos; B - Identificação da variante SPTB: c.1264C>T; p.Gln422Ter em heterozigotia por sequenciação de Sanger (caso 6).



**Figura 21** - A - Esfregaço de sangue periférico com eliptócitos (seta amarela) e esferócitos (seta preta) do caso 34; e B - Identificação da variante SPTB: c.154C>T em heterozigotia por sequenciação de Sanger no caso 34.

**Tabela 7** - Casos com variantes identificadas no *SPTB*, idades, género, parâmetros bioquímicos e estudos funcionais (Retic% - percentagem de reticulócitos, Bilir. Total- Bilirrubina total).

Caso	Idade	Género	Hb (g/dl)	VCM (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Retic. %	Bilir. total	Ferritina	EMA	Ectacitometria	Crioteste
6	3 anos	M	7,4	78,4	23,9	30,5	13,3			0,8	Sugestivo de EH	Positivo
7	22 anos	M	12,4	78,3	28,4	36,3	13,3	10,7	378	0,6		Positivo
30	2 meses	M	10,5	81,9	28,8	35,1	0,3	0,22				
32	9 anos	F								7,6		Positivo
34	7 meses	M	10,8	71,8	26,3	36,6	1,9	0,5	8257	0,8	Sugestivo de E립tocitose	Normal

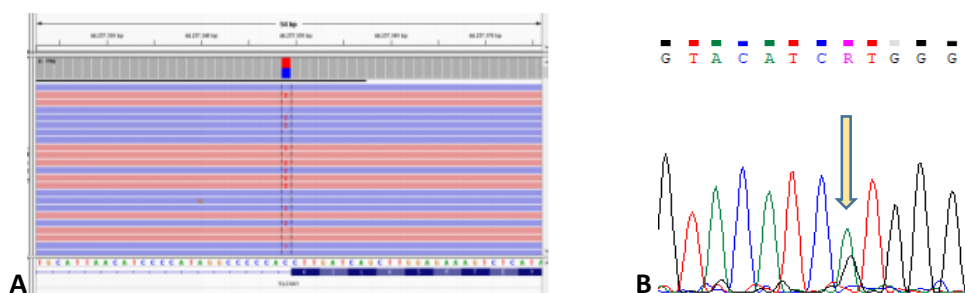


**Figura 22** - Esquematização da localização na proteína β-espectrina das variantes encontradas no *SPTB*; na cadeia de aminoácidos (Aa) e no gene (*SPTB*-exões). A variante encontrada no caso 34 localiza-se no domínio de ligação à actina, a do caso 6 no domínio de dimerização, a do caso 7 nas repetições de espectrina, a do caso 32 no domínio de ligação à anquirina e a variante encontrada no caso 30 localiza-se no domínio de tetramerização da espectrina.

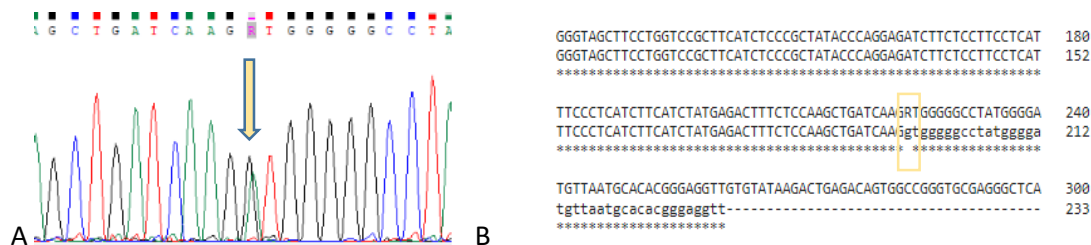
### Grupo III – Amostras com variantes no gene *SLC4A1*

Neste gene identificaram-se 3 variantes do tipo *missense* e 4 de *splicing*. Apenas duas já se encontram descritas como associadas a esferocitose hereditária de transmissão autossómica dominante (caso 2 e 14). Os resultados laboratoriais foram agrupados na Tabela 8. No caso 14 identificou-se a variante *missense* *SLC4A1*: c.1462G>A que resulta na troca de uma valina por uma metionina na posição 488 da proteína da banda 3 denominada *Banda 3 Coimbra*. A sua identificação por NGS e confirmação por sequenciação de Sanger encontram-

se representadas na Figura 23. No caso 24 foi identificada uma variante de *splicing* SLC4A1: c.1626+1G>A em heterozigotia (Figura 24), não descrita na literatura, mas encontram-se descritas outras variantes de *splicing* no mesmo intrão, como causadoras de esferocitose hereditária de transmissão dominante (SLC4A1: c.1627-1G>T, SLC4A1: c.1626G>A) (Fermo *et al*, 2021) (Van Zwiten *et al*, 2013). A localização na proteína de todas as variantes identificadas encontra-se esquematizada na Figura 25.



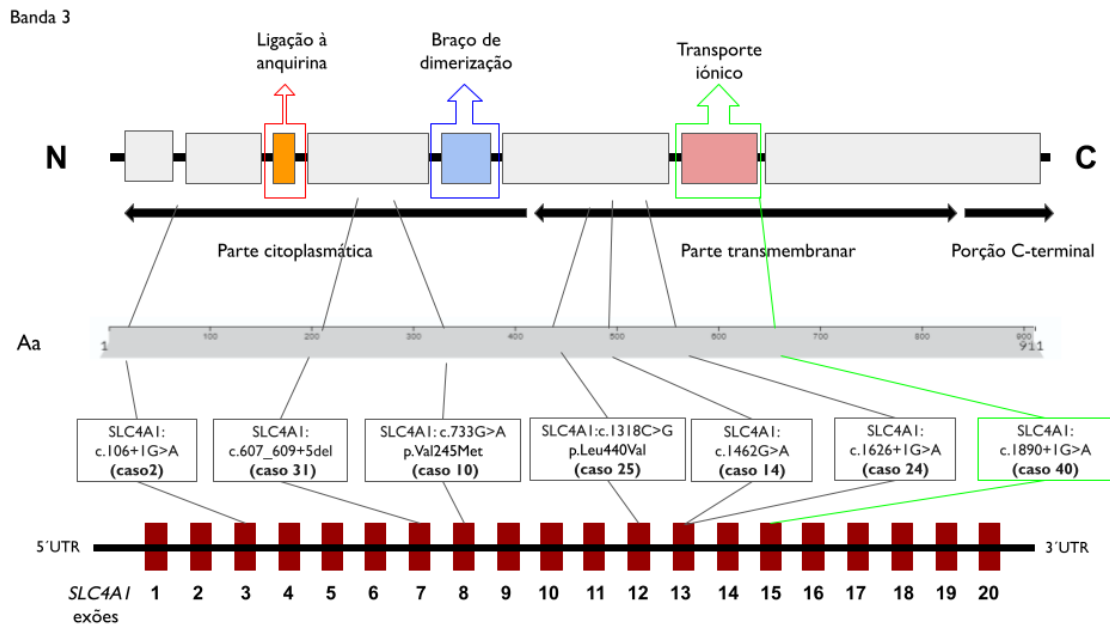
**Figura 23** - Identificação da variante *banda 3 Coimbra* por NGS (A) e por sequenciação de Sanger (B) no caso 14.



**Figura 24** - Identificação da variante SLC4A1: c.1626+1G>A em heterozigotia por sequenciação de Sanger e alinhamento com a seqüência de referência no Clustal Omega no caso 24.

**Tabela 8**- Casos com variantes identificadas no SLC4A1, idades, género, parâmetros bioquímicos e estudos funcionais (Retic% - percentagem de reticulócitos, Bilir. total- Bilirrubina total).

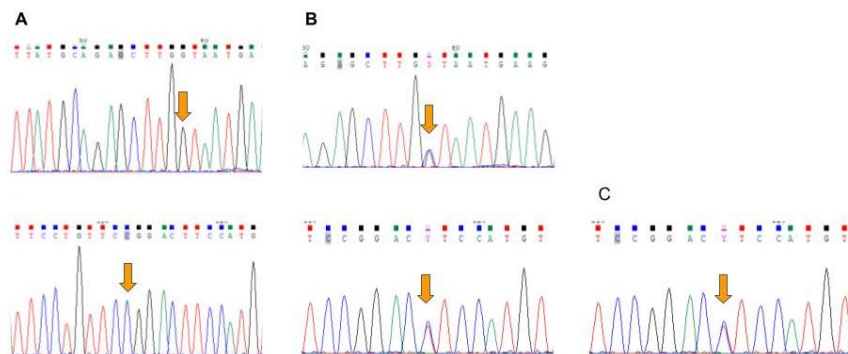
Caso	Idade	Género	Hb (g/dl)	VCM (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Retic %	Bilir. total	Ferritina (mg/dl)	EMA	Ectacitometria	Crioste
2	42 anos	F	12,9	89,5	32,2	35,9	4,31				Sugestivo de EH	Positivo
10	17 meses	F								1,1	Normal	
14	38 anos	M	14,5	92,9	34,2	36,8	6,60	2,5	733	0,5		Positivo
24	32 anos	F										
25	24 anos	M										
31	2 anos	M									Sugestivo de EH	Normal
40	12 meses	M	11,6	71,2	24,4	34,3	3,60	0,3	67,3	0,72		Normal



**Figura 25** - Esquema da localização das variantes encontradas no gene, na cadeia de aminoácidos e na proteína. As variantes identificadas nos casos 2, 31 e 10 localizam-se na parte citoplasmática da Banda 3, as identificadas nos casos 25, 14 e 24 na parte transmembranar e a variante identificada no caso 40 encontra-se no domínio de transporte iônico da proteína banda 3.

#### Grupo IV – Amostras com variantes no gene *SPTA1*

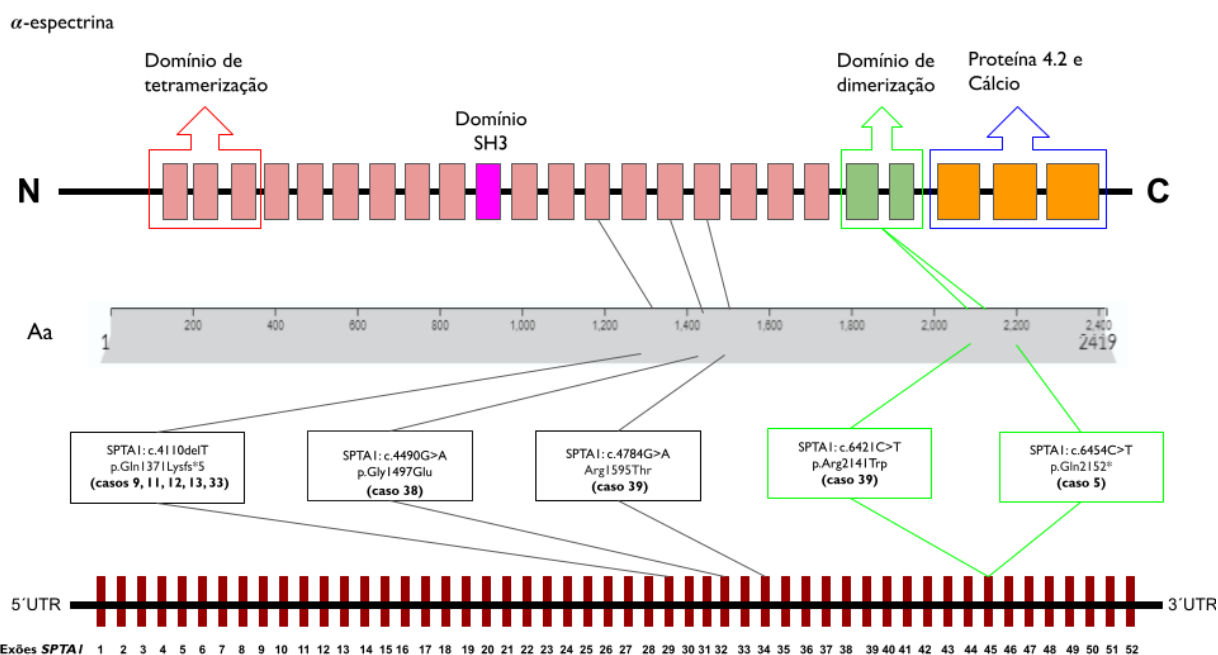
No gene *SPTA1* foi onde se encontrou um maior número de variantes, uma vez que foi identificada uma grande deleção neste gene, presente em 3 amostras. Em todos os casos com variantes encontradas no *SPTA1* foi feita a pesquisa por sequenciação de Sanger dos polimorfismos mais frequente, responsáveis por uma diminuição da produção de  $\alpha$ -espectrina (Lely, Lepra e Prague), também chamados alelos de baixa expressão (Figura 26). Os resultados dos estudos laboratoriais foram agrupados na Tabela 9. A representação da localização na proteína das variantes encontradas está na Figura 27.



**Figura 26** - Identificação das variantes *SPTA1*: c.5572C>G e c.6531-12C>T chamadas polimorfismo  $\alpha$ -Lely em homocigotia (A) e em heterocigotia (B) e da variante *SPTA1*: c.4339-99C>T chamada polimorfismo  $\alpha$ -Lepra (C) em heterocigotia por sequenciação de Sanger.

**Tabela 9** - Casos com variantes identificadas no *SPTA1*, idades, género, parâmetros bioquímicos e estudos funcionais (Retic% - percentagem de reticulócitos, Bilir. total- Bilirrubina total).

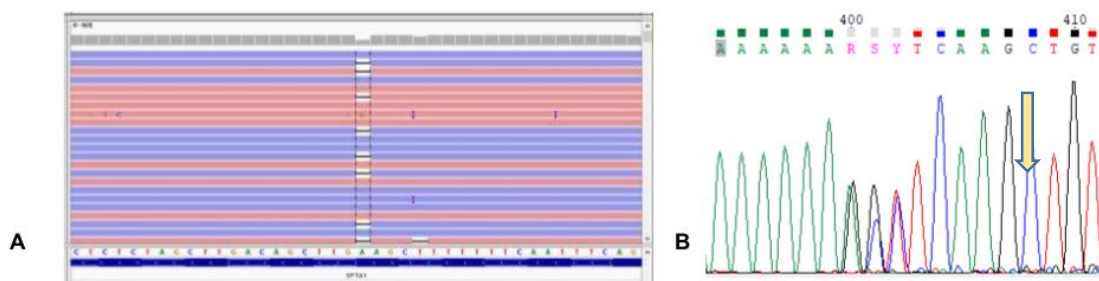
Caso	Idade	Género	Hb (g/dl)	VCM (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Retic %	Bilir. total	Ferritina (mg/dl)	EMA	Ectacitometria	Crioteste
5	77 anos	M								0.98	Normal	Positivo
9	47 dias	F	6,6	82,4	29,1	35,3	5,5	1,9	634,5	0.84	Sugestivo EH	Positivo
11	43 anos	F	6,8	92,6	31,3	33,8	9,9	3,3	91,35	0.94	Sugestivo EH	Normal
12	43 anos	F	12,1	93,7	31,8	33,9	5,6			0.96	Sugestivo EH	Positivo
13	37 anos	F								1.05		
16	52 anos	M	12,7	87,9	30,7	34,9	9,5	4,3	550	0.5		Positivo
17	36 dias	M	9,9	85,1	29,6	34,7	12,6				Sugestivo EH	
20	14 anos	M	12,2	88,1	27,9	31,7	5,22			0.7	Sugestivo EH	Positivo
21	6 anos	F	7,9	86,7	29,2	33,6	9,8	2,5	821			
22	41 anos	F	12,1	92	31,3	34,4	5,68	1,51	210	1.06	Sugestivo EH	Positivo
26	42 anos	M	11,1	95,3	34	35,7	9,66	15,4	131		Normal	Positivo
33	63 anos	F	11,1	90,3	30,9	34,3	3,6	1,9	298	0.83	Sugestivo EH	Positivo
39	49 dias	M										
44	63 anos	M	12,6	90,9	32,7	36	4,9	4,1	242		Sugestivo EH	Positivo



**Figura 27** - Esquema representativo da localização das variantes encontradas no gene *SPTA1* na proteína, na cadeia de aminoácidos e no gene. A variante encontrada nos casos 9, 11, 12, 13 e 33 encontra-se localizada na repetição 12 da espectrina, a do caso 38 na repetição 14 e a do caso 39 na repetição 15 da espectrina. As variantes identificadas nos casos 5 e 39 afetam o domínio de dimerização.



A mesma variante patogénica, SPTA1: c.4110delT foi identificada em 5 casos (casos 9, 11, 12, 13 e 33) (Tabela 4) e pesquisada por sequenciação de Sanger também em alguns familiares (Figura 28) pelo que os resultados moleculares e funcionais destes casos e familiares foram sistematizados na Tabela 10.

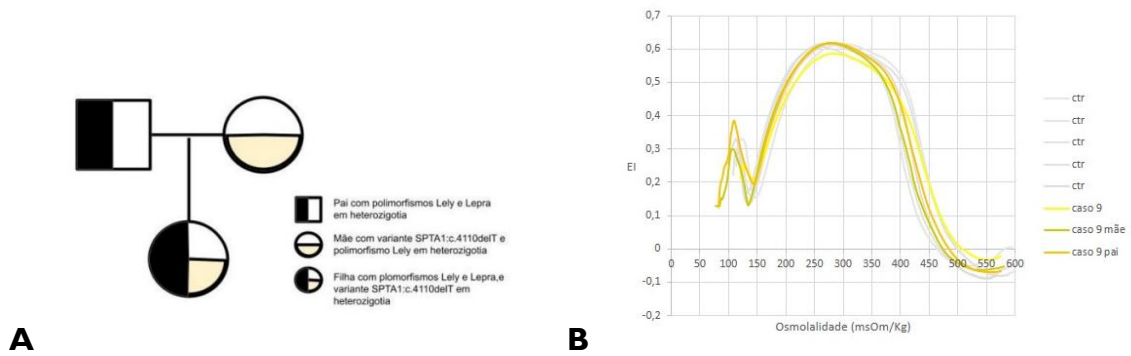


**Figura 28** - Identificação da variante patogénica frameshift SPTA1: c.4110delT em heterozigotia por NGS(A) e sequenciação de Sanger (B).

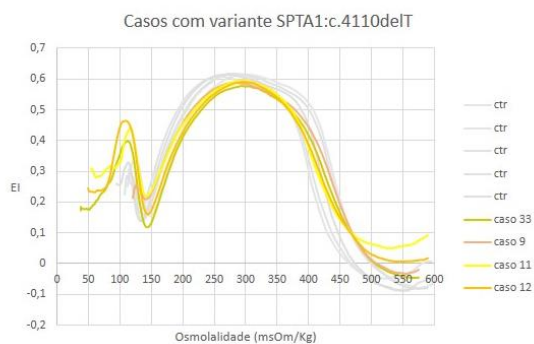
**Tabela 10** - Caracterização molecular dos casos com a variante SPTA1: c.4110delT e familiares estudados; parâmetros bioquímicos e estudos funcionais.

Caso	Alelo 1	Alelo 2	S. Gilbert	EMA	Crioteste	Ectacitometria	Hb	Retic. %
9	c.4110delT+ α-Lely	α-Lepra	Sim	0.84	Positivo	Sugestiva de EH	6.6	5.5
Mãe (9)	c.4110delT+ α-Lely	α -Lely	Não		Normal	Normal	14.5	2.5
Pai (9)	α-Lely	α -Lepra	Não		Normal	Normal	15.9	3.4
11	c.4110delT+ α-Lely	α -Lely	Não	0.94	Normal	Sugestiva de EH	6.8	9.9
Irmão (11)	c.4110delT+ α-Lely	α -Lely	Não	0.96	Positivo	Normal	11.2	6.2
12	c.4110delT+ α-Lely	α -Lely	Não	0.96	Positivo	Sugestiva de EH	12.1	5.6
13	c.4110delT+ α-Lely	α -Lely	Não	1.05				
33	c.4110delT+ α-Lely	α -Lely	Não	0.83	Positivo	Sugestiva de EH	11.1	3.6
Filha (33)	c.4110delT+ α-Lely	α -Lely	Não		Normal	Sugestiva de EH	13	2.5

No caso 9 foi possível estudar ambos os pais, sendo possível perceber a herança do genótipo composto pela variante e o polimorfismo α-Lely em trans com o polimorfismo α-Lepra (Figura 29-A) e fazer uma comparação das curvas de ectacitometria obtidas da doente e dos pais. (Figura 29-B). Em todos os outros casos com a variante SPTA1: c.4110delT, foi também identificado o polimorfismo α-Lely em heterozigotia (Tabela 10). As curvas de ectacitometria são muito idênticas (com perfil normal ou com Elmáx ligeiramente diminuído) com exceção do caso 9, com Elmáx mais diminuído que os restantes (Figura 30). No caso 9 foi também identificada a presença em homozigotia da inserção c.856-6786\_856-6785insTA na região promotora do gene UGT1A1, denominada Síndrome de Gilbert.



**Figura 29** - Heredograma do caso 9 (A) e Osmoscan do caso 9 e dos pais (B).

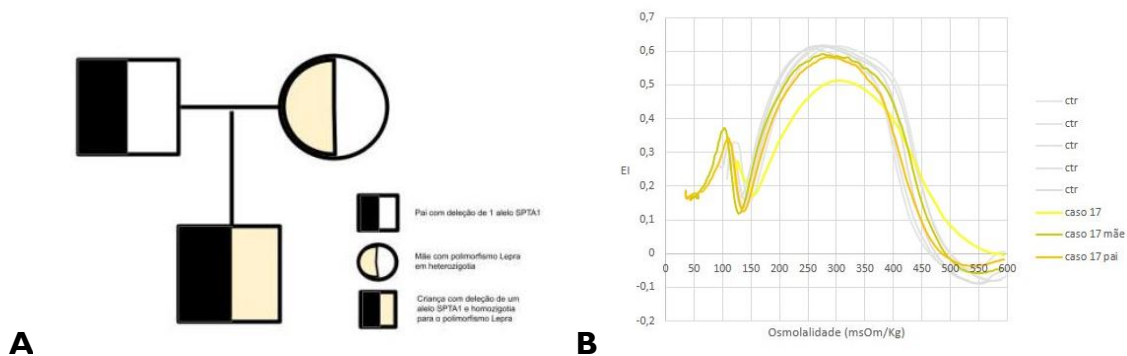


**Figura 30** - Osmoscan dos casos com a variante patogénica SPTA1: c.4110delT.

Nos casos 16, 17, 20, 21, 22, 26 e 44 os estudos moleculares revelaram o mesmo padrão dos polimorfismos do gene SPTA1 em homozigotia em todos os amplicões, sugestivo de grande deleção no gene. O estudo por Array confirmou a deleção de todo o gene num dos alelos nos casos 16, 17 e 26 e nos restantes aguardamos estudos complementares para confirmação da deleção.

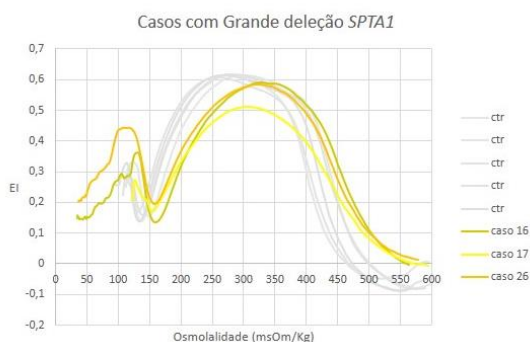
Na pesquisa dos polimorfismos nos casos com deleção confirmada identificou-se o  $\alpha$ -Lely em homozigotia nos casos 16 e 26 e o polimorfismo  $\alpha$ -Lepra em homozigotia no caso 17 (Tabela 4). No caso 17 fizeram-se estudos familiares nos pais e detetou-se o polimorfismo  $\alpha$ -Lepra em heterozigotia na mãe e no pai o mesmo padrão de homozigotia em todos os amplicões do SPTA1, sugestivo de grande deleção (Figura 31-A). Ambos os pais se encontram assintomáticos e com estudos funcionais normais, à exceção de um crioteste positivo no pai.

Sobrepondo as curvas de ectacitometria do caso 17 e dos pais verifica-se um perfil normal nos pais e um Elmáx diminuído no doente (Figura 31-B).



**Figura 31-** Heredograma do caso 17 (A) e curvas de ectacitometria do caso 17 e dos pais (B).

Fazendo a comparação dos osmoscans nos três casos com grande deleção *SPTA1* verifica-se que os casos com  $\alpha$ - Lely associado têm um perfil quase normal, com Elmáx muito ligeiramente diminuído e Omáx aumentado; enquanto que no caso 17, com o  $\alpha$ - Lepra associado à deleção se observa um Elmáx nitidamente diminuído (Figura 32).



**Figura 32 -** Osmoscans dos casos com Grande deleção *SPTA1* (casos 16, 17 e 26)

## Grupo V – Amostras com variantes no gene *PIEZO1*

Neste grupo estão dois casos com a mesma variante frameshift *PIEZO1*: c.7488\_7489insCTGGAG no exão 51 em heterozigotia e descrita como associada a xerocitose hereditária de transmissão autossómica dominante (AD) (Tabela 4). Os resultados laboratoriais foram agrupados na Tabela II.

**Tabela II-** Casos com variantes identificadas no *PIEZO1*, idades, género, parâmetros bioquímicos e estudos funcionais (Retic% - percentagem de reticulócitos, Bilir. Total- Bilirrubina total).

Caso	Idade	Género	Hb (g/dl)	VCM (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Retic %	Bilir. total	Ferritina (mg/dl)	EMA	Ectacitometria	Crioteste
37	2 anos	F	11	83,9	31,6	37,7	8,1	0,8	151			
41	6 anos	M	14,3	82,2	31,5	38,3	4,70	0,7	26,34	0,99	Sugestivo Xerocitose	Positivo

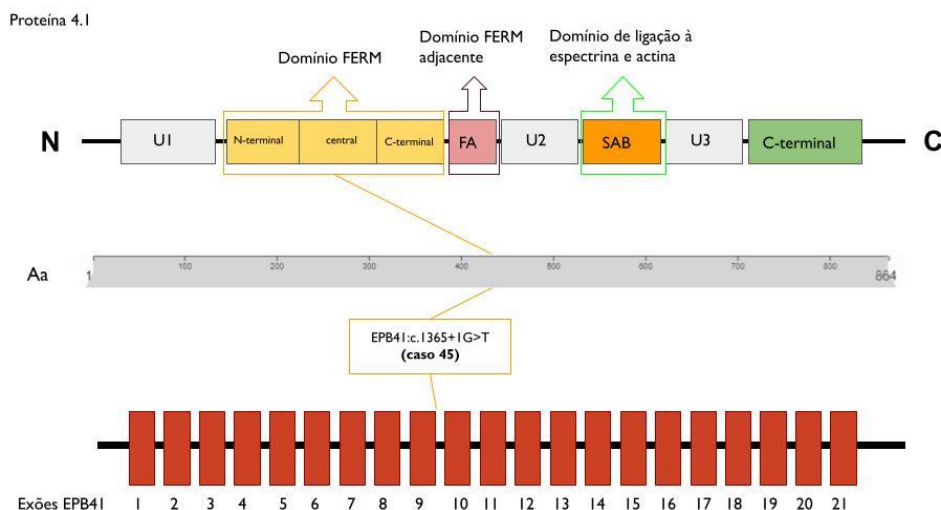
No caso 41 temos valores de EMA e crioteste positivos e uma curva osmoscan sugestiva de xerocitose hereditária (Figura 17). A variante foi confirmada por sequenciação de Sanger e encontrada também em heterozigotia na mãe.

## GRUPO VI – Amostra com variante no gene EPB41:

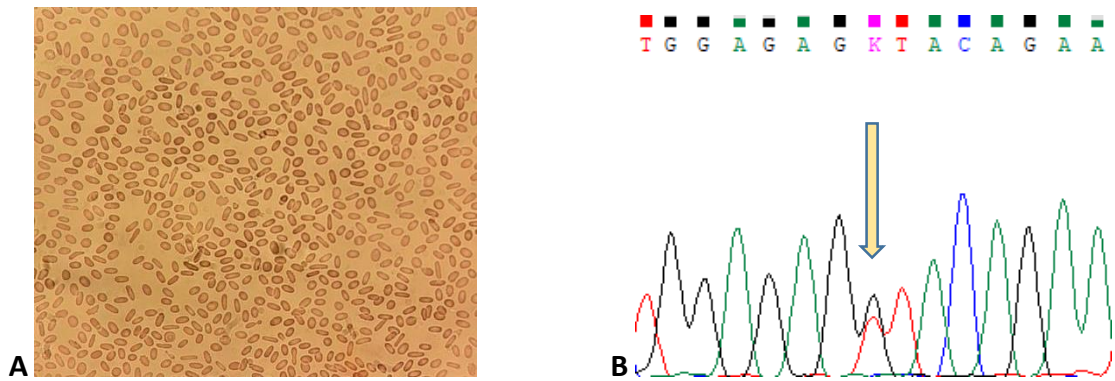
Identificou-se no caso 45 a variante de splicing EPB41: c.1365+1G>T em heterozigotia, provavelmente patogénica e localizada no domínio FERM da proteína 4.1 (Figura 33). Os resultados funcionais e de bioquímica estão sistematizados na Tabela 12. No ESP foi possível observar que quase todas as células são eliptócitos (Figura 34-A). A variante foi confirmada por sequenciação de Sanger (Figura 34-A) e pesquisada na mãe e num irmão, tendo sido identificada apenas na mãe.

**Tabela 12** - Caso com variantes identificada no *EPB41*, idade, género, parâmetros bioquímicos e estudos funcionais (Retic% - percentagem de reticulócitos, Bilir. Total- Bilirrubina total).

Caso	Idade	Género	Hb (dl)	VCM (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Retic %	Bilir. total	Ferritina(mg/dl)	EMA	Ectacitometria	Crioteste
45	14 anos	F	11.9	82.2	26.4	32.2	1.32				Sugestivo de Eliptocitose	Positivo

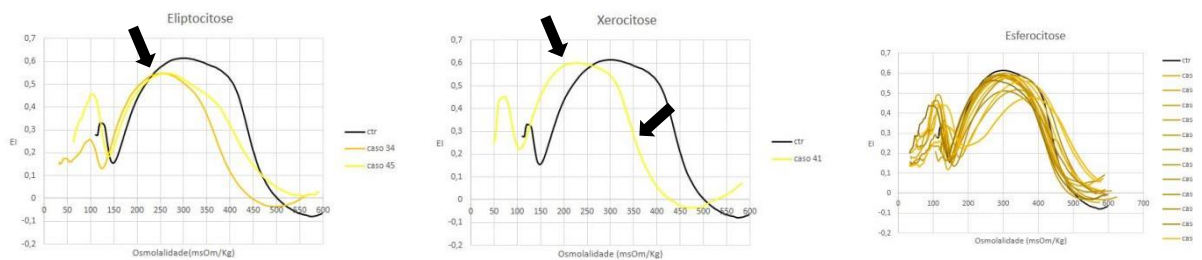


**Figura 33** - Esquema da localização da variante encontrada EPB41: c.1365+1G>T na proteína, na cadeia de aminoácidos e no gene. A variante identificada no caso 45 afeta na proteína o domínio FERM.



**Figura 34** - ESP com maioria das células eliptocitos(A) e Identificação da variante EPB41: c.1365+1G>T em heterozigotia por sequenciação de Sanger (B)

Após a análise dos resultados e validação dos fenótipos dos doentes estudados foi possível fazer ainda um estudo comparativo dos osmoscan agrupados por patologia (Figura 35).



**Figura 35** - Curvas de ectacitometria das amostras estudadas agrupadas por patologia. Elmáx diminuído e perfil achatado nas eliptocitose, Eimáx normal, Ohyper e Omáx diminuídos na xerocitose e Eimáx diminuído e Omáx aumentado ou normal nas esferocitoses.

## Discussão

As diferentes formas de patologia de membrana do GV têm origem em variantes patogénicas nos genes que codificam as proteínas que constituem a membrana. Deste modo, identificar essas variantes é o único método de diagnóstico definitivo nestas patologias. Além disso, a compreensão da relação entre a variante genética e o fenótipo da doença é de extrema importância quando queremos orientar a prática clínica neste tipo de patologias.

### Grupo I (variantes encontradas no gene ANKI)

O *ANK1* codifica a proteína anquirina da membrana do GV e variantes neste gene são as responsáveis por 50 a 60% dos casos de esferocitose hereditária de transmissão autossómica dominante (AD), recessiva (AR) ou *de novo* (maioritariamente AD). A proteína anquirina faz a ligação do citoesqueleto da membrana à bicamada lipídica, ligando à  $\beta$ -espectrina dos tetrâmeros de espectrina no citoplasma, e à proteína banda 3 da membrana. Os doentes com variantes patogénicas da anquirina têm uma esferocitose com uma gravidade clínica que varia de ligeira a grave, dependendo da extensão da perda de membrana resultante da deficiente ancoragem do citoesqueleto de espectrina à membrana eritrocitária (Haspal *et al.*, 1991). A maioria das variantes no *ANK1* encontradas neste estudo localizam-se no domínio de ligação da anquirina à membrana (casos 4, 8, 19, 36, 38 e 43). Nestes o fenótipo variou de leve a moderado, o que podemos correlacionar com o tipo de variante: As variantes *frameshift*, *splicing* e *nonsense* estão associadas a fenótipos mais moderados e a variante *missense* está associada a um fenótipo mais leve (caso 38 e 43).

A variante ANKI: c.2920\_2921insGGGCCTCGCCAGCA;p.Ile975Alafs\*7 encontrada no domínio de ligação à espectrina (caso 1) resultou no fenótipo mais grave deste grupo, com necessidade de transfusão. Este achado vem confirmar que, uma vez que a anquirina liga a  $\beta$ -espectrina à banda 3, a deficiência de anquirina leva a uma diminuição proporcional e secundária do arranjo de espectrinas na membrana, apesar da síntese normal de espectrina. Consequentemente as mutações do *ANK1* no domínio de ligação à espectrina resultam tanto em deficiências de anquirina como de espectrina e este facto está associado à gravidade da doença (Park *et al.*, 2016).

Os gráficos de ectacitometria neste grupo são todos concordantes com patologia de membrana, nomeadamente esferocitose hereditária, com  $Emax < 0.6$  e  $Omax$  aumentado (Figura 17). O caso 1 foi aquele que resultou numa curva mais alterada, pelo que podemos

inferir uma relação da gravidade do fenótipo com as características do gráfico da ectacitometria, sendo a gravidade da doença maior quanto maior a diminuição do  $El_{máx}$  e quanto maior o  $Om_{áx}$ . (Figura 17- Casos com variantes no ANKI e Tabela 5).

Os resultados dos testes EMA foram positivos em quase todas as amostras à exceção do caso I, com fenótipo mais grave, o que indica que nem sempre este teste é útil no diagnóstico das variantes do ANKI.

Com exceção da variante de *splicing* ANKI: c.1801-17G>A, descrita como associada a esferocitose hereditária e classificada como patogénica (caso 4) e da variante ANKI: c. c.253G>A; p. Ala85Thr, também descrita associada a EH mas classificada como VUS (caso 38 e 43); todas as outras variantes encontradas nos estudos moleculares deste grupo ainda não se encontram descritas na literatura. Na análise *in silico* das variantes não descritas, 6 são provavelmente patogénicas e a restante é uma variante de significado indeterminado (VUS). Este achado vem reforçar a grande importância de utilização de painéis de NGS de modo mais abrangente no diagnóstico destas doenças de modo a trazer novo conhecimento e gerar mais dados que permitam estabelecer uma relação genótipo-fenótipo.

No caso em que foi possível realizar estudos familiares (caso I), verificou-se que se trata de uma variante *de novo*. As restantes variantes encontradas, todas em heterozigotia, resultarão pela classificação OMIM em esferocitose hereditária tipo I de transmissão autossómica dominante ou *de novo*.

## **Grupo II (variantes encontradas no gene SPTB)**

O gene SPTB codifica a proteína  $\beta$ -espectrina. A  $\beta$ -espectrina é um dos constituintes do citoesqueleto da membrana eritrocitária, enrolada em heterodímeros com a  $\alpha$ -espectrina. As variantes patogénicas neste gene podem causar dois tipos de fenótipo conforme o domínio da proteína que é afetado; variantes que afetam o domínio de tetramerização da espectrina resultam numa diminuição da integridade mecânica da membrana dos eritrócitos e estão associadas a eliptocitose; enquanto variantes que afetam a ancoragem da espectrina à membrana ou outros que se traduzam numa diminuição efetiva do número de cadeias funcionais de  $\beta$ -espectrina causam esferocitose (Andolfo *et al.*, 2016).

Encontramos neste grupo o maior número relativo de variantes *nonsense*, o que parece estar associado a um fenótipo de esferocitose tipo II, com transmissão AD. No caso 6 por

exemplo, a variante encontrada afeta o domínio de dimerização da espectrina (Figura 22) (potencialmente eliptogénica), mas sendo uma variante *nonsense* no início da transcrição da proteína a sua consequência será uma proteína disfuncional e com consequências agravantes do fenótipo.

Dos estudos familiares realizados conseguimos concluir a herança autossómica dominante característica em dois casos (6 e 34) e no caso 32 uma esferocitose hereditária de ocorrência *de novo*.

No caso 30, a localização da variante sugere que estará comprometido o domínio de tetramerização da espectrina (Figura 22), o que aponta para uma alteração na deformabilidade da membrana e um fenótipo de eliptocitose tipo III (de transmissão AD). Clinicamente o doente tem um quadro grave que à partida não corresponderia a uma eliptocitose, no entanto o facto de se tratar de um bebé de apenas 2 meses, ainda com uma quantidade considerável de Hb F poderá justificar este fenótipo, uma vez que sabemos que a Hb F tem características desestabilizadoras da membrana. Não temos estudos familiares nem funcionais neste caso que permitam confirmar esta teoria.

No caso 34, devido à localização da variante no domínio de ligação da espectrina à actina (Figura 22), o fenótipo mais provável seria de eliptocitose hereditária; no entanto a variante está descrita como associada a um fenótipo de EH. O doente chegou referenciado para estudo familiar de eliptocitose hereditária e os estudos funcionais, nomeadamente crioteste normal e ectacitometria característica de eliptocitose vêm dar força à primeira hipótese de eliptocitose. Na observação do ESP desta amostra identificou-se poiquilocitose, alguns esferócitos e alguns eliptócitos (Figura 21-A). Neste caso seria pertinente fazer uma nova avaliação mais tarde, uma vez que a criança tem apenas 7 meses e o seu fenótipo poderá estar alterado ainda pela presença de alguma HbF.

Quando se compararam as curvas de ectacitometria das amostras com variantes no gene *SPTB* verificou-se que, apesar de todas serem sugestivas de patologia de membrana (com  $El_{máx} < 0.6$ ) (Tabela 15), os seus perfis são notoriamente diferentes. A curva do caso 6 mostra um perfil típico de esferocitose, com  $El_{máx} < 0.6$  e  $Omáx$  e  $Ohiper$  deslocados à direita (Figura 17); enquanto a curva do caso 34 tem um perfil de eliptocitose, com  $El_{máx} < 0.6$  e  $Ohyper$  diminuído (Figura 17- casos com variantes no *SPTB* e Tabela 15). Neste grupo de variantes os resultados de crioteste e EMA não demonstraram ser informativos para o diagnóstico, uma



vez que encontramos valores normais de EMA em dois casos e valores normais de crioteste num dos casos.

### **Grupo III (variantes encontradas no gene SLC4A1)**

A proteína Banda 3 é a proteína integral mais abundante da membrana e além de fazer o transporte iónico é a principal responsável pela ancoragem vertical da bicamada lipídica ao citoesqueleto do GV. Qualquer anomalia nesta ancoragem resulta numa desestabilização da membrana, com vesiculação, perda de superfície e aparecimento de esferócitos. As variantes no gene SLC4A1 causam esferocitose hereditária do tipo 4, de transmissão AD (OMIM.org). As variantes de transmissão AR neste gene causam ovalocitose do Sudeste Asiático ou Criohidrocitose, condições muito raras. O teste funcional mais sensível para diagnóstico de esferocitose hereditária por deficiência ou perda de banda 3 é o teste EMA, cujo fluorocromo liga especificamente à banda 3, o que se traduz em resultados muito positivos quando a EH se deve à perda de superfície de membrana por variante patogénica no *SLC4A1*. Outra particularidade na patologia de membrana por alterações na banda 3 do eritrócito é a presença no ESP de células em forma de cogumelo (*pincerred cells*), e que foi possível observar no caso 2.

No caso 10 temos EMA e ectacitometria normais, o que não faria desconfiar de patologia de membrana. A variante missense encontrada no *SLC4A1*, classificada como VUS deverá dar fenótipo muito leve ou haverá outras causas de AH não devidamente excluídas para este doente.

No caso 14 temos um valor de EMA de 0.5 (muito positivo) e foi identificada a variante SLC4A1: c.1462G>A; p.Val488Met, designada *Banda 3 Coimbra*. Esta variante patogénica foi descrita pela primeira vez em 1997 num estudo de 33 amostras em famílias portuguesas. (B. N. Alloisio *et al.*, n.d.-b). Esta variante em heterozigotia causa esferocitose hereditária típica, associada a uma deficiência parcial de banda 3, por outro lado, o doente homozigótico para a mutação da Banda 3 Coimbra foi considerado completamente desprovido da banda 3 nos eritrócitos e tem um fenótipo grave (Ribeiro *et al.*, 2000). Neste caso a variante está em heterozigotia, o que justifica os valores de Hb normais e reticulocitose moderada.

Os gráficos Osmoscan obtidos para este grupo são sugestivos de patologia de membrana, no entanto observam-se perfis diferentes. No caso 2 apenas se encontrou o Elmáx diminuído, enquanto no caso 31 se observou o Elmáx diminuído e o Ohyper aumentado (Tabela 5). As alterações na banda 3 estão também muitas vezes relacionados com um défice

secundário de proteína 4.2 (que estabiliza a ligação da banda 3 à anquirina), o mecanismo associado a este achado não está totalmente esclarecido, mas supõe-se que as variantes patogénicas localizadas nos domínios citoplasmáticos da banda 3 alteram o local de ligação da proteína 4.2 (Satchwell *et al.*, 2015). Podemos assim relacionar o perfil de osmoscan do caso 31 com um fenótipo mais grave, em que existe uma diminuição da deformabilidade dos eritrócitos por perda de membrana devido à variante patogénica no *SLC4A1* e défice secundário da proteína 4.2.

O crioteste não foi útil no diagnóstico de patologia de membrana do GV por variantes na proteína da banda 3, tendo dado resultados normais nos casos 31 e 40.

Apenas se fizeram estudos familiares no caso 31 que confirma a herança AD com a identificação da variante no pai.

#### **Grupo IV (variantes encontradas no gene SPTAI)**

O gene *SPTAI* codifica para a proteína  $\alpha$ -espectrina, principal constituinte do citoesqueleto da membrana eritrocitária juntamente com a  $\beta$ -espectrina. Variantes neste gene de transmissão AD resultam num fenótipo de eliptocitose hereditária do tipo 2, enquanto variantes de transmissão autossómica recessiva resultam em esferocitose hereditária do tipo 3 ou em casos mais graves Piropoiquilocitose hereditária (OMIM.org).

Nos casos 9, 11, 12, 13 e 33 encontrou-se a mesma variante patogénica *frameshift* *SPTAI*:4110delT em heterozigotia. Dois alelos *SPTAI* normais permitem a produção excessiva de cadeias de  $\alpha$ -espectrina numa proporção de 3-4:1 em relação à  $\beta$ -espectrina, pelo que um alelo *SPTAI* mutado é normalmente bem tolerado. Mesmo o polimorfismo  $\alpha$ -Lely, que causa uma diminuição de 50% na quantidade de  $\alpha$ -espectrina, quando em *trans* com outro alelo *SPTAI* nulo, não causa doença, indicando que a produção de 25% de  $\alpha$ -espectrina normal é suficiente para uma membrana saudável (Delaunay, Jean *et al*). Nos casos 11, 12, 13 e 33 encontramos um alelo mutado juntamente com o polimorfismo  $\alpha$ -Lely em homozigotia (Tabela 12), que se traduz num fenótipo de esferocitose hereditária do tipo 3, de transmissão autossómica recessiva, com parâmetros bioquímicos pouco alterados e estudos funcionais normais ou ligeiramente positivos. O perfil das curvas de ectacitometria nestes casos são todos semelhantes, dentro do normal ou com Elmáx muito ligeiramente diminuído (Tabela 5 e Figura 30).

No caso 9, uma menina com necessidade de transfusão, a pesquisa dos polimorfismos identificou a presença do  $\alpha$ -Lely e do  $\alpha$ -Lepra, ambos em heterozigotia (Tabela 12). O  $\alpha$ -Lepra produz apenas cerca de 16% de espectrina em comparação com o alelo normal, pelo que, quando em *trans* com um alelo *SPTAI* nulo (conduzindo a uma produção total de  $\alpha$ -espectrina de cerca de 8%) demonstrou causar EH autossômica recessiva grave. Neste caso foi possível fazer os estudos familiares nos pais e concluir que a filha herdou no mesmo alelo da mãe a variante e o polimorfismo  $\alpha$ -Lely, em *trans* com o alelo  $\alpha$ -Lepra herdado do pai (Figura 29-A). Este achado é coerente com os estudos funcionais positivos e vem justificar a gravidade clínica da criança. Os pais são assintomáticos, com estudos funcionais normais, sem anemia e apenas com alguma reticulocitose. A mãe tem um genótipo semelhante aos restantes casos em que identificamos a variante (*SPTAI*: c.4110delT/ $\alpha$ -Lely em homozitotia), enquanto o pai, sem variante identificada, tem os polimorfismos  $\alpha$ -Lely e  $\alpha$ -Lepra em *trans*. Neste caso haverá ainda cerca de 33% de produção de espectrina, portanto será assintomático. Sobrepondo as curvas de ectacitometria do caso 9 com os pais podemos confirmar que se observam curvas normais para os pais e um *Elmáx* diminuído na filha (Figura 29-B).

É importante notar que esta variante (*SPTAI*: c.4110delT) se encontra descrita apenas uma vez em 2020 (Svidnicki *et al.*,2020) e neste estudo foi identificada em 5 casos e 3 familiares (Tabela 10). Na classificação de variantes no gene *SPTAI*, e devido ao facto de este gene ser muito polimórfico, é de extrema importância incluir a existência dos alelos de baixa expressão como critério de patogenicidade, pois a presença da variante por si só pode não ser traduzida em fenótipo mas juntamente com alelos de baixa expressão, principalmente em *trans* pode resultar num fenótipo mais grave.

No caso 5 identificou-se uma variante *nonsense* não descrita e o polimorfismo  $\alpha$ -Lely, ambos em heterozigotia. Neste caso não foi possível fazer estudos familiares para determinar se as variantes se encontram em *cis* ou em *trans*, isto é, se se trata de um fenótipo de esferocitose hereditária do tipo 3 AR ou de eliptocitose hereditária do tipo 2 AD. A ausência de parâmetros de bioquímica e de ESP também não nos permite tirar conclusões. Os resultados dos estudos funcionais de EMA e ectacitometria normais, e crioteste ligeiramente positivo orientam a suspeita para o fenótipo mais leve de eliptocitose hereditária de transmissão AD.

No caso 39 identificaram-se duas variantes no *SPTAI*, ambas em heterozigotia. Uma das variantes encontra-se descrita associada a piropoiquilocitose quando associada em *trans*

ao polimorfismo  $\alpha$ -Lely, o que poderia orientar o diagnóstico; no entanto não se encontrou nenhum dos alelos de baixa expressão do *SPTA1* nesta doente. O que temos é outra variante identificada no mesmo gene, mas a ausência de estudos familiares não permite concluir se estará em *cis* ou em *trans*. A gravidade do fenótipo e a possível associação em heterozigotia composta das duas variantes *SPTA1* orientam o diagnóstico para piropoiquilocitose.

Nos restantes casos incluídos neste grupo (16, 17 e 26) a presença em todos os amplicões de todos os polimorfismos do gene *SPTA1* em homozigotia levou à suspeita de uma grande deleção no gene. O estudo por Array veio confirmar a suspeita de deleção nestes casos. Assim, com apenas um alelo *SPTA1*, a presença ou não de polimorfismos de baixa expressão ou outras variantes neste gene serão determinantes no fenótipo destes doentes.

Nos casos 16 e 26 a pesquisa de polimorfismos encontrou apenas o  $\alpha$ -Lely em homozigotia, o que resulta num fenótipo mais moderado; já no caso 17, além da grande deleção identificou-se o polimorfismo  $\alpha$ -Lepra em homozigotia, que resulta num fenótipo grave. Os estudos familiares revelaram o mesmo padrão de homozigotia dos polimorfismos *SPTA1* sugestivo de grande deleção no pai e não se identificaram os alelos de baixa expressão. Na mãe encontrou-se apenas, em heterozigotia o polimorfismo  $\alpha$ -Lepra. O  $\alpha$ -Lepra condiciona uma diminuição de produção de espectrina para 16% do normal, o que com a ausência do outro alelo significa uma produção de apenas cerca de 8%. Essa diminuição drástica da produção leva a uma redução de quase 40% da espectrina na membrana (Delaunay *et al.*, 2004). A mãe com apenas polimorfismo  $\alpha$ -Lepra em heterozigotia terá uma produção total de proteína de cerca de 58% sendo portanto assintomática e com estudos funcionais normais. O pai não tem polimorfismos mas com 1 alelo *SPTA1* deletado, portanto com 50% de produção de espectrina, é também assintomático.

As curvas de ectacitometria do caso 17 e dos pais confirmam os genótipos encontrados, com perfil normal em ambos os pais e com um perfil típico de esferocitose no filho (Figura 31-B).

### **Grupo V (variantes encontradas no gene *PIEZO1*)**

Variantes encontradas neste gene causam alterações nos canais Piezo I da membrana eritrocitária, responsáveis pela regulação da permeabilidade aos catiões de  $K^+$  e  $Na^+$  e consequentemente pela viscosidade e volume celulares dos eritrócitos. Variantes patogénicas

neste gene traduzem-se mais frequentemente num fenótipo de estomatocitose hereditária desidratada (xerocitose) de transmissão AD. Nos casos 37 e 41 (sem relação familiar) identificou-se a mesma variante localizada no domínio de ligação Piezo-R-Ras, responsável pela formação do poro.

No caso 41 os estudos familiares confirmam a herança AD, com a identificação da variante no pai. Com EMA normal, é a ectacitometria que confirma o diagnóstico neste caso, exibindo uma curva característica de Xerocitose, notoriamente deslocada para a esquerda. (com Elmáx normal e Omin e Ohyper diminuídos) (Tabela 5).

### **Grupo VI (variante encontrada no gene EPB41)**

No caso 45 identificou-se uma variante em heterozigotia no gene EPB41, a única encontrada neste gene no nosso estudo. A variante não está descrita na literatura mas variantes neste gene estão associadas ao fenótipo de eliptocitose hereditária tipo I AD ou AR. A observação do ESP e a curva de ectacitometria confirmam o fenótipo de Eliptocitose hereditária. Os estudos familiares confirmam a transmissão de forma AD.

## Conclusões

Fazendo uma análise retrospectiva dos resultados obtidos com o nosso estudo e após a validação dos respetivos fenótipos na totalidade das amostras estudadas, verificamos que nas 45 amostras estudadas foi possível identificar 66% de casos de EH, 4% de Elip H e 4% de Xerocitoses hereditárias. Em todos os casos, a suspeita inicial ou a orientação clínica prévias foram confirmadas positivamente.

Observando os perfis dos Osmoscans agora divididos por esferocitose, eliptocitose e xerocitose hereditárias (Figura 35) verificamos que as curvas de ectacitometria demonstraram ser eficazes no diagnóstico diferencial nas patologias de membrana do eritrócito. Foi possível distinguir esferocitoses de eliptocitoses e de xerocitose pela análise do perfil de cada osmoscan, com  $El_{máx}$  diminuído e perfil achatado das curvas na eliptocitose; com curva deslocada para a esquerda ( $Oh_{yper}$  e  $Omáx$  diminuídos e  $El_{máx}$  normal) na xerocitose; e  $El_{máx}$  diminuído e  $Omáx$  normal ou aumentado nas esferocitoses (Figura 35).

A ectacitometria pode ser uma ferramenta rápida e eficaz para fazer o diagnóstico diferencial das xerocitoses hereditárias, de extrema importância em casos graves em que se equacione a tomada de decisão clínica de esplenectomia. Por outro lado, os outros testes funcionais (crioteste e EMA) não se mostraram vantajosos, com vários resultados incoerentes com o fenótipo.

O estudo molecular por NGS, tal como vem sendo notado nos estudos mais recentes, demonstrou ser de grande utilidade para identificar e descrever novas variantes associadas a estas patologias, o que ficou patente ao identificarmos neste estudo 19 variantes não descritas (mais de 50% da totalidade das variantes encontradas). Também este facto vem evidenciar uma vez mais a necessidade e a utilidade de mais estudos moleculares, mais abrangentes e sistemáticos nestas patologias.

É necessária uma análise crítica da informação obtida dos painéis de NGS; da informação explícita na listagem de variantes encontradas mas também da informação menos explícita, como acontece na presença de padrões em homozigotia de polimorfismos no gene SPTAI que fornece uma pista para uma possível deleção neste gene, que deve ser explorada e confirmada por outras metodologias.

## Bibliografia

- ALLOISIO, B. N., Texier, P., Vallier, A., Ribeiro, M., Morlé, L., Bozon, M., Bursaux, E., Maillet, P., Gonçalves, P., Tanner, M., Tamagnini, G., & Delaunay, J. (n.d.-a). *Modulation of Clinical Expression and Band 3 Deficiency in Hereditary Spherocytosis Allele Genes bears a nucleotide substitution in the 5' untranslated region*.
- ALLOISIO, B. N., Texier, P., Vallier, A., Ribeiro, M., Morlé, L., Bozon, M., Bursaux, E., Maillet, P., Gonçalves, P., Tanner, M., Tamagnini, G., & Delaunay, J. (n.d.-b). *Modulation of Clinical Expression and Band 3 Deficiency in Hereditary Spherocytosis Allele Genes bears a nucleotide substitution in the 5' untranslated region*. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/90/1/414/1643189/414.pdf>
- ALLOISIO, N., Morle, L., Marechal, J., Roux, A. F., Ducluzeau, M. T., Guetarni, D., Pothier, B., Baklouti, F., Ghanem, A., Kastally, R., & Delaunay, J. (1991). Sp $\alpha$ (V/41): A common spectrin polymorphism at the  $\alpha$ IV- $\alpha$ V domain junction: Relevance to the expression level of hereditary elliptocytosis due to  $\alpha$ -spectrin variants located in trans. *Journal of Clinical Investigation*, 87(6), 2169–2177. <https://doi.org/10.1172/JCI115250>
- AN, X., & Mohandas, N. (2008). Disorders of red cell membrane. *British Journal of Haematology*, 141(3), 367–375. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07091.x>
- ANDOLFO, I., Russo, R., Gambale, A., & Iolascon, A. (2016). New insights on hereditary erythrocyte membrane defects. In *Haematologica* (Vol. 101, Issue 11, pp. 1284–1294). Ferrata Storti Foundation. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.142463>
- ANK1 - Ankyrin-1 - *Homo sapiens* (Human) | UniProtKB | UniProt. (n.d.). Retrieved June 26, 2023, from [https://www.uniprot.org/uniprotkb/P16157/entry#family\\_and\\_domains](https://www.uniprot.org/uniprotkb/P16157/entry#family_and_domains)
- ATTINA G, Triarico S, Romano A, Maurizi P, Mastrangelo S, Ruggiero A. Role of Partial Splenectomy in Hematologic Childhood Disorders. *Pathogens*. 2021 Nov 5;10(11):1436. doi: 10.3390/pathogens10111436. PMID: 34832592; PMCID: PMC8620563.
- BALDWIN C, Pandey J, Olarewaju O. Hemolytic Anemia. [Updated 2023 Jul 24]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan

Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558904/>

- BASKURT, O. K., Boynard, M., Cokelet, G. C., Connes, P., Cooke, B. M., Forconi, S., Liao, F., Hardeman, M. R., Jung, F., Meiselman, H. J., Nash, G., Nemeth, N., Neu, B., Sandhagen, B., Shin, S., Thurston, G., & Wautier, J. L. (2009). New guidelines for hemorheological laboratory techniques. In *Clinical Hemorheology and Microcirculation* (Vol. 42, Issue 2, pp. 75–97). <https://doi.org/10.3233/CH-2009-1202>
- BEATRIZ, A., Borges, T., Regina, M., Moura, S., Nascimento, L. C., Filho, A. B., & Geraldo, C. (n.d.). *Hereditary Pyropoikilocytosis in the Neonatal Period-Case Report*.
- BENNETT, V., & Healy, J. (2008). Organizing the fluid membrane bilayer: diseases linked to spectrin and ankyrin. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 14, Issue 1, pp. 28–36). <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.11.005>
- bgl.png (851×244)*. (n.d.). Retrieved June 20, 2023, from <https://files.passeidireto.com/5f09365c-fff0-478c-8d10-f23480450dd1/bgl.png>
- BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit*. (n.d.). Retrieved June 19, 2023, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4337452>
- BRAUNREITER, C. L. (2018). Novel mutation in SPTA 1 gene associated with severe hemolytic anemia. *Journal of Pediatrics & Neonatal Care*, 8(5). <https://doi.org/10.15406/jpnc.2018.08.00351>
- CASTILLA L, Aspa J, Nieto JM, Cabrera ÁZ, Santiago M, Feria AG, Marco Buades JE, Marina MA, Ayala Diaz RM, Sanchez R, Orbe Barreto RD, Lobo Olmedo A, Dávila-Valls J, Martín-Pérez S, Jativa Saez C, Rodriguez IH, Salido E, Recasens V, Fernández LG, Moreno Risco MB, Fernández AG, Rubio ML. PI480: CLINICAL AND GENETIC STUDY OF HEREDITARY SPHEROCYTOSIS IN THE SPANISH POPULATION. *Hemasphere*. 2023 Aug 8;7(Suppl ):e6313050. doi: 10.1097/01.HS9.0000972804.63130.50. PMID: PMC10430647.
- CHONAT, S., Risinger, M., Sakthivel, H., Niss, O., Rothman, J. A., Hsieh, L., Chou, S. T., Kwiatkowski, J. L., Khandros, E., Gorman, M. F., Wells, D. T., Maghathe, T., Dagaonkar, N., Seu, K. G., Zhang, K., Zhang, W., & Kalfa, T. A. (2019a). The Spectrum of SPTA1-



- Associated Hereditary Spherocytosis. *Frontiers in Physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00815>
- CHONAT, S., Risinger, M., Sakthivel, H., Niss, O., Rothman, J. A., Hsieh, L., Chou, S. T., Kwiatkowski, J. L., Khandros, E., Gorman, M. F., Wells, D. T., Maghathe, T., Dagaonkar, N., Seu, K. G., Zhang, K., Zhang, W., & Kalfa, T. A. (2019b). The Spectrum of SPTAI-Associated Hereditary Spherocytosis. *Frontiers in Physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00815>
- Chromas | Technelysium Pty Ltd. (n.d.). Retrieved June 19, 2023, from <https://technelysium.com.au/wp/chromas/>
- CIEPIELA O. Old and new insights into the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Ann Transl Med*. 2018 Sep;6(17):339. doi: 10.21037/atm.2018.07.35. PMID: 30306078; PMCID: PMC6174190.
- Clustal Omega < Multiple Sequence Alignment < EMBL-EBI. (n.d.). Retrieved June 12, 2023, from <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
- CUNHA, S. R., & Mohler, P. J. (2009). Ankyrin protein networks in membrane formation and stabilization. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(11–12), 4364–4376. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00943.x>
- DA COSTA, L., Galimand, J., Fenneteau, O., & Mohandas, N. (2013). Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood Reviews*, 27(4), 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2013.04.003>
- DA COSTA, L., Suner, L., Galimand, J., Bonnel, A., Pascreau, T., Couque, N., Fenneteau, O., & Mohandas, N. (2016). Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders: Assessment of a new generation ektacytometer. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 56(1), 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2015.09.001>
- DEAN L. Blood Groups and Red Cell Antigens [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005. Table I, Complete blood count. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2263/table/chI.TI/>
- DE JESUS PINTO, W., Eduardo de Marialva, J., Maria Guida Cardoso, S., & Arcanjo Areas, M. (2010). ARTIGO DE REVISÃO Topologia das principais proteínas da membrana e do

- citoesqueleto eritrocitário Topology of the main proteins of erythrocyte membrane and cytoskeletal. In *Méd. Biol* (Issue 1). <http://align.genome.jp/>
- DELAUNAY, J., Nouyrigat, V., Proust, A., Schischmanoff, P. O., Cynober, T., Yvart, J., Gaillard, C., Danos, O., & Tchernia, G. (2004). Different impacts of alleles  $\alpha$ LEPRA and  $\alpha$ LELY as assessed versus a novel, virtually null allele of the SPTA1 gene in trans. *British Journal of Haematology*, 127(1), 118–122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05160.x>
- DZIERZAK, E., & Philipsen, S. (2013). Erythropoiesis: Development and differentiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011601>
- Ensembl genome browser 109. (n.d.). Retrieved June 12, 2023, from <https://www.ensembl.org/index.html>
- EPB41 - Protein 4.1 - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt. (n.d.). Retrieved June 26, 2023, from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P11171/entry#P11171-1>
- FERMO, E., Vercellati, C., Marcello, A. P., Keskin, E. Y., Perrotta, S., Zaninoni, A., Brancaleoni, V., Zanella, A., Giannotta, J. A., Barcellini, W., & Bianchi, P. (2021a). Targeted Next Generation Sequencing and Diagnosis of Congenital Hemolytic Anemias: A Three Years Experience Monocentric Study. *Frontiers in Physiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.684569>
- FERMO, E., Vercellati, C., Marcello, A. P., Keskin, E. Y., Perrotta, S., Zaninoni, A., Brancaleoni, V., Zanella, A., Giannotta, J. A., Barcellini, W., & Bianchi, P. (2021b). Targeted Next Generation Sequencing and Diagnosis of Congenital Hemolytic Anemias: A Three Years Experience Monocentric Study. *Frontiers in Physiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.684569>
- FERMO, E., Vercellati, C., Marcello, A. P., Zaninoni, A., van Wijk, R., Mirra, N., Curcio, C., Cortelezzi, A., Zanella, A., Barcellini, W., & Bianchi, P. (2017). Hereditary Xerocytosis due to Mutations in PIEZO1 Gene Associated with Heterozygous Pyruvate Kinase Deficiency and Beta-Thalassemia Trait in Two Unrelated Families. *Case Reports in Hematology*, 2017, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/2769570>
- FILSER, M., Giansily-Blaizot, M., Elanie Grenier, M. ´, Alonso, D. M., Bouyer, G., Erèser`, L. P. ´, St´, S., Egée, S., Egée, E., Aral, B., Airaud, F., Da Costa, L., Eronique Picard, V. ´, Cougoul, P., Ene Palach, M., St´stéphane, S., Eline Garrec, C. ´, Aguilar-Martinez, P., Gardie, B., & Girodon, F. (n.d.). *Letters to Blood Increased incidence of germline PIEZO1 mutations in*

individuals with idiopathic erythrocytosis. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/137/13/1828/1803881/bloodbl2020008424.pdf>

GAETANI, M., Mootien, S., Harper, S., Gallagher, P. G., & Speicher, D. W. (2008). *Structural and functional effects of hereditary hemolytic anemia-associated point mutations in the alpha spectrin tetramer site*. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11>

GALLAGHER, P. G. (2005). Red Cells Red Cell Membrane Disorders. In *Hematology*. <http://ashpublications.org/hematology/article-pdf/2005/1/13/645048/013.pdf>

GALLAGHER, P. G., Maksimova, Y., Lezon-Geyda, K., Newburger, P. E., Medeiros, D., Hanson, R. D., Rothman, J., Israels, S., Wall, D. A., Sidonio, R. F., Sieff, C., Kate Gowans, L., Mittal, N., Rivera-Santiago, R., Speicher, D. W., Baserga, S. J., & Schulz, V. P. (2019). Aberrant splicing contributes to severe  $\alpha$ -spectrin-linked congenital hemolytic anemia. *Journal of Clinical Investigation*, 129(7), 2878–2887. <https://doi.org/10.1172/JCI127195>

GARBARZ, M., Lecomte, M.-C., Feo, C., Devaux, I., Picat, C., Lefebvre, C., Galibert, F., Gautero, H., Bournier, O., Galand, C., Forget, B. G., Boivin, P., & Dhermy, D. (1990). Hereditary Pyropoikilocytosis and Elliptocytosis in a White French Family (Arg to His) at Position 22 of the Spectrin  $\alpha$ I Domain With the Spectrin Variant Related to a CGT to CAT Codon Change. In *Blood* (Vol. 75, Issue 8).

GLOGOWSKA, E., & Gallagher, P. G. (2015). Disorders of erythrocyte volume homeostasis. In *International Journal of Laboratory Hematology* (Vol. 37, Issue S1, pp. 85–91). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12357>

HANSPAL, M., Hanspal, J. S., Sahr, K. E., Fibach, E., Nachman, J., & Palek, J. (n.d.). *Molecular Basis of Spectrin Deficiency in Hereditary Pyropoikilocytosis*. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/82/5/1652/611107/1652.pdf>

*Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0*. (n.d.). Retrieved June 19, 2023, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4480441>

*Ion OneTouch™ 2 System*. (n.d.). Retrieved June 19, 2023, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4474779>

*Ion Reporter | Thermo Fisher Scientific*. (n.d.). Retrieved June 19, 2023, from <https://ionreporter.thermofisher.com/ir/>

IPSARO JJ, Harper SL, Messick TE, Marmorstein R, Mondragón A, Speicher DW. Crystal

structure and functional interpretation of the erythrocyte spectrin tetramerization domain complex. *Blood*. 2010 Jun 10;115(23):4843-52. doi: 10.1182/blood-2010-01-261396. Epub 2010 Mar 2. PMID: 20197550; PMCID: PMC2890174.

JAMWAL M, Aggarwal A, Sachdeva MUS, Sharma P, Malhotra P, Maitra A, Das R. Overhydrated stomatocytosis associated with a complex RHAG genotype including a novel *de novo* mutation. *J Clin Pathol*. 2018 Jul;71(7):648-652. doi: 10.1136/jclinpath-2018-205018. Epub 2018 Mar 20. PMID: 29559519

JIANG, N., Mao, W.-Y., Peng, B.-X., Yang, T.-Y., & Mao, X.-R. (2023). Clinical manifestations of adult hereditary spherocytosis with novel SPTB gene mutations and hyperjaundice: A case report. *World Journal of Clinical Cases*, 11(6), 1349–1355. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v11.i6.1349>

KAESTNER, L., & Bogdanova, A. (2014). Regulation of red cell life-span, erythropoiesis, senescence and clearance. In *Frontiers in Physiology: Vol. 5 JUN*. Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00269>

KANZAKI, A., Hayette, S., Morlé, L., Inoue, F., Matsuyama, R., Inoue, T., Yawata, A., Wada, H., Vallier, A., Alloisio, N., Yawata, Y., & Delaunay, J. (1997). Total absence of protein 4.2 and partial deficiency of band 3 in hereditary spherocytosis. *British Journal of Haematology*, 99(3), 522–530. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1997.4263231.x>

KIM, Y., Park, J., & Kim, M. (2017). Diagnostic approaches for inherited hemolytic anemia in the genetic era. In *Blood Research* (Vol. 52, Issue 2, pp. 84–94). Korean Society of Hematology. <https://doi.org/10.5045/br.2017.52.2.84>

KING, M. J., Garçon, L., Hoyer, J. D., Iolascon, A., Picard, V., Stewart, G., Bianchi, P., Lee, S. H., & Zanella, A. (2015). ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders. *International Journal of Laboratory Hematology*, 37(3), 304–325. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12335>

KOTULA, L., Laury-kleintop, L. D., Showe, L., Sahr, K., Linnenbach, A. J., Forget, B., & Curtis, P. J. (n.d.). *The Exon-Intron Organization of the Human Erythrocyte dpectrin Gene*.

KOURY MJ, Ponka P. New insights into erythropoiesis: the roles of folate, vitamin B12, and iron. *Annu Rev Nutr*. 2004;24:105-31. doi: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.1

PMID: 15189115.

KULSETH, M. A. (n.d.). *Variant classification according to the ACMG Guidelines The results from the variant classification in different Norwegian laboratories.*

LEW, V. L., & Tiffert, T. (2013). The terminal density reversal phenomenon of aging human red blood cells. *Frontiers in Physiology*, 4 JUL. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00171>

LLAUDET-Planas, E., Vives-Corróns, J. L., Rizzuto, V., Gómez-Ramírez, P., Sevilla Navarro, J., Coll Sibina, M. T., García-Bernal, M., Ruiz Llobet, A., Badell, I., Velasco-Puyó, P., Dapena, J. L., & Mañú-Pereira, M. M. (2018). Osmotic gradient ektacytometry: A valuable screening test for hereditary spherocytosis and other red blood cell membrane disorders. *International Journal of Laboratory Hematology*, 40(1), 94–102. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12746>

MAGALHÃES Maia, T., Bento, C., & Leticia Ribeiro Lección, M. (2017). *Eritropatología. Eritropoyesis.*

MANGLA A, Ehsan M, Agarwal N, et al. Sickle Cell Anemia. [Updated 2022 Nov 30].

In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-

-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482164/>

MARTÍNEZ Vázquez C, López Rubio M, Del Orbe Barreto R. Southeast Asian ovalocytosis.

Med Clin (Barc). 2022 Oct 14;159(7):347-348. English, Spanish. doi:

10.1016/j.medcli.2022.03.025. Epub 2022 Jul 21. PMID: 35871012

MEISELMEN, H. J., & Baskurt, O. K. (2003). *The Hyperviscosity Syndromes* (Vol. 29, Issue 5).

MÉJÉCASE, C., Hummel, A., Mohand-Saïd, S., Andrieu, C., El Shamieh, S., Antonio, A., Condroyer, C., Boyard, F., Foussard, M., Blanchard, S., Letexier, M., Saraiva, J. P., Sahel, J. A., Zeitz, C., & Audo, I. (2019). Whole exome sequencing resolves complex phenotype and identifies CC2D2A mutations underlying non-syndromic rod-cone dystrophy. *Clinical Genetics*, 95(2), 329–333. <https://doi.org/10.1111/cge.13453>

MicroSEQ™ ID Software for SeqStudio™ Genetic Analyzer v1.0. (n.d.). Retrieved June 12, 2023, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/g>

MOHANDAS, N., & Gallagher, P. G. (2008). *Red cell membrane: past, present, and future.* <https://doi.org/10.1182/blood-2008>

- MORROW, J. S., Speicher, D. W., Knowles, W. J., Hsu, C. J., & Marchesit, V. T. (1980). Identification of functional domains of human erythrocyte spectrin (peptide maps/cytoskeleton/membrane binding/peptide association/protein structure). In *Cell Biology* (Vol. 77, Issue 11). <https://www.pnas.org>
- NARLA, J., & Mohandas, N. (2017). Red cell membrane disorders. In *International Journal of Laboratory Hematology* (Vol. 39, pp. 47–52). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12657>
- NISS, O., Chonat, S., Dagaonkar, N., Almansoori, M. O., Kerr, K., Rogers, Z. R., McGann, P. T., Quarmyne, M. O., Risinger, M., Zhang, K., & Kalfa, T. A. (2016). Genotype-phenotype correlations in hereditary elliptocytosis and hereditary pyropoikilocytosis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 61, 4–9. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2016.07.003>
- PAN, L., Yan, R., Li, W., & Xu, K. (2018). Super-Resolution Microscopy Reveals the Native Ultrastructure of the Erythrocyte Cytoskeleton. *Cell Reports*, 22(5), 1151–1158. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.107>
- PARK, J., Jeong, D. C., Yoo, J., Jang, W., Chae, H., Kim, J., Kwon, A., Choi, H., Lee, J. W., Chung, N. G., Kim, M., & Kim, Y. (2016). Mutational characteristics of ANKI and SPTB genes in hereditary spherocytosis. *Clinical Genetics*, 90(1), 69–78. <https://doi.org/10.1111/cge.12749>
- PARROW NL, Violet PC, Tu H, Nichols J, Pittman CA, Fitzhugh C, Fleming RE, Mohandas N, Tisdale JF, Levine M. Measuring Deformability and Red Cell Heterogeneity in Blood by Ektacytometry. *J Vis Exp*. 2018 Jan 12;(131):56910. doi: 10.3791/56910. PMID: 29364234; PMCID: PMC5908551.
- PERROTTA, S., Gallagher, P. G., & Mohandas, N. (2008). Hereditary spherocytosis. In *The Lancet* (Vol. 372, Issue 9647, pp. 1411–1426). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61588-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61588-3)
- PIEZO1 - Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1 - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt.* (n.d.). Retrieved June 26, 2023, from [https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q92508/entry#family\\_and\\_domains](https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q92508/entry#family_and_domains)
- Practical Hematology; Tenth Edition; 2006, S M Lewis, B J Bain, I Bates; Churchill Livingstone

QIASymphony SP/AS instruments. (n.d.). Retrieved June 12, 2023, from <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/instruments-equipment/qiasymphony-spas-instruments>

Qubit Fluorometric Quantification | Thermo Fisher Scientific - PT. (n.d.). Retrieved June 19, 2023, from <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit.html?gclid=CjwKCAjw-b-kBhB-EiwA4fvKrD>

RAOS M, Lukic M, Pulanic D, Vodanovic M, Cepulic BG. The role of serological and molecular testing in the diagnostics and transfusion treatment of autoimmune haemolytic anaemia. *Blood Transfus.* 2022 Jul;20(4):319-328. doi:

10.2450/2021.0235-21. Epub 2021 Oct 15. PMID: 34694224; PMCID: PMC9256513.

RIBEIRO, M. L., Alloisio, N., Almeida, H., Gomes, C., Texier, P., Lemos, C., Mimoso, G., Morlé, L., Fai'za Bey-Cabet, F., Rudigoz, R.-C., Delaunay, J., & Tamagnini, G. (2000). Severe hereditary spherocytosis and distal renal tubular acidosis associated with the total absence of band 3.

RICHARDS, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>

SÁNCHEZ VILLALOBOS, M., Salido Fierrez, E., Martínez Nieto, J., García Garay, M. C., Beltrán Videla, A., Pérez Oliva, A. B., Blanquer Blanquer, M., & Moraleda Jiménez, J. M. (2022). Case Report:  $\alpha$ -Spectrin Mutation Associated with  $\alpha$ LELY Polymorphism Responsible for Hereditary Pyropoikilocytosis. *Hematology Reports*, 14(4), 300–304. <https://doi.org/10.3390/hematolrep14040043>

SATCHWELL TJ, Hawley BR, Bell AJ, Ribeiro ML, Toyé AM. The cytoskeletal binding domain of band 3 is required for multiprotein complex formation and retention during erythropoiesis. *Haematologica.* 2015 Jan;100(1):133-42. doi:

10.3324/haematol.2014.114538. Epub 2014 Oct 24. PMID: 25344524; PMCID: PMC4281326.

SLC4A1 - Band 3 anion transport protein - *Homo sapiens (Human)* | UniProtKB | UniProt. (n.d.). Retrieved June 26, 2023, from [https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02730/entry#family\\_and\\_domains](https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02730/entry#family_and_domains)

SPTA1 - Spectrin alpha chain, erythrocytic I - *Homo sapiens (Human)* | UniProtKB | UniProt. (n.d.). Retrieved June 26, 2023, from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02549/entry#P02549-1>

SPTB - Spectrin beta chain, erythrocytic - *Homo sapiens (Human)* | UniProtKB | UniProt. (n.d.). Retrieved June 26, 2023, from [https://www.uniprot.org/uniprotkb/P11277/entry#family\\_and\\_domains](https://www.uniprot.org/uniprotkb/P11277/entry#family_and_domains)

SVIDNICKI, M. C. C. M., Zanetta, G. K., Congrains-Castillo, A., Costa, F. F., & Saad, S. T. O. (2020). Targeted next-generation sequencing identified novel mutations associated with hereditary anemias in Brazil. *Annals of Hematology*, 99(5), 955–962. <https://doi.org/10.1007/s00277-020-03986-8>

S M LEWIS B, Practical Hematology; Tenth Edition;

TAMARY H, Dgany O. Alpha-Thalassemia. 2005 Nov 1 [Updated 2020 Oct 1]. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1435/>

TANG, X., Guo, X., & Gao, J. (2020). A Novel Compound Heterozygous Mutation in SLC4A1 Gene Causing Severe Hereditary Spherocytosis and Distal Renal Tubular Acidosis. In *Indian Journal of Pediatrics* (Vol. 87, Issue 3, pp. 233–234). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12098-019-03171-4>

The Bio-Rad Literature Library | Bio-Rad. (n.d.). Retrieved June 12, 2023, from [https://www.bio-rad.com/en-pt/literature-library?f%5B0%5D=literature\\_type\\_facet\\_literature\\_library%3AManuals\\_and\\_Quick\\_Guides&page=0](https://www.bio-rad.com/en-pt/literature-library?f%5B0%5D=literature_type_facet_literature_library%3AManuals_and_Quick_Guides&page=0)



- TOLE, S., Dhir, P., Pugi, J., Drury, L. J., Butchart, S., Fantauzzi, M., Langer, J. C., Baker, J. M., Blanchette, V. S., Kirby-Allen, M., & Carcao, M. D. (2020). Genotype–phenotype correlation in children with hereditary spherocytosis. *British Journal of Haematology*, *191*(3), 486–496. <https://doi.org/10.1111/bjh.16750>
- Torrent Variant Calling*. (n.d.). Retrieved June 19, 2023, from <https://tools.epigenetic.ru/ts-doc/ion-docs/GUID-D838F137-454B-4150-8362-D5DC51070242.html>
- VAN VUREN, A., Van Der Zwaag, B., Huisjes, R., Lak, N., Bierings, M., Gerritsen, E., Van Beers, E., Bartels, M., & Van Wijk, R. (2019). The Complexity of Genotype-Phenotype Correlations in Hereditary Spherocytosis: A Cohort of 95 Patients: Genotype-Phenotype Correlation in Hereditary Spherocytosis. *HemaSphere*, *3*(4). <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000276>
- Version, -en. (n.d.). *Lorcca Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer*.
- VIVES-Corróns, J. L., Krishnevskaia, E., Hernández-Rodríguez, I., Payán-Pernia, S., Sevilla, Á. F. R., & Badell, I. (2022). Red cell ektacytometry in two patients with chronic hemolytic anemia and three new  $\alpha$ -spectrin variants. *Annals of Hematology*, *101*(3), 549–555. <https://doi.org/10.1007/s00277-021-04723-5>
- VON KANEL, T., Röthlisberger, B., Schanz, U., Dutly, F., Huber, A. R., & Saller, E. (2013). A Swiss ( $\epsilon\gamma\delta\beta$ )<sup>0</sup>-thalassemia patient with a novel 3-Mb deletion associated with mild mental impairment. In *American Journal of Hematology* (Vol. 88, Issue 2, pp. 158–159). <https://doi.org/10.1002/ajh.23364>
- WICHTERLE, H., Hanspal, M., Palek, J., & Jarolim, P. (1996). Combination of two mutant alpha spectrin alleles underlies a severe spherocytic hemolytic anemia. *Journal of Clinical Investigation*, *98*(10), 2300–2307. <https://doi.org/10.1172/JCI119041>
- WICHTERLE, H., Hanspal, M., Palek, J., Jarolim, P., Wichterle, H., Hanspal, M., Palek, J., & Jarolim, P. (1996). Combination of Two Mutant Alpha Spectrin Alleles Underlies a Severe Spherocytic Hemolytic Anemia. In *J. Clin. Invest* (Vol. 98, Issue 10).
- ZAIDI, A. U., Buck, S., Gadgeel, M., Herrera-Martinez, M., Mohan, A., Johnson, K., Bagla, S., Johnson, R. M., & Ravindranath, Y. (2020). Clinical Diagnosis of Red Cell Membrane Disorders: Comparison of Osmotic Gradient Ektacytometry and Eosin Maleimide (EMA) Fluorescence Test for Red Cell Band 3 (AEI, SLC4A1) Content for Clinical Diagnosis. *Frontiers in Physiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00636>

- ZANINONI, A., Fermo, E., Vercellati, C., Consonni, D., Marcello, A. P., Zanella, A., Cortelezzi, A., Barcellini, W., & Bianchi, P. (2018a). Use of laser assisted optical rotational cell analyzer (LoRRca MaxSis) in the diagnosis of RBC membrane disorders, enzyme defects, and congenital dyserythropoietic anemias: A monocentric study on 202 patients. *Frontiers in Physiology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00451>
- ZANINONI, A., Fermo, E., Vercellati, C., Consonni, D., Marcello, A. P., Zanella, A., Cortelezzi, A., Barcellini, W., & Bianchi, P. (2018b). Use of laser assisted optical rotational cell analyzer (LoRRca MaxSis) in the diagnosis of RBC membrane disorders, enzyme defects, and congenital dyserythropoietic anemias: A monocentric study on 202 patients. *Frontiers in Physiology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00451>
- ZARYCHANSKI, R., Schulz, V. P., Houston, B. L., Maksimova, Y., Houston, D. S., Smith, B., Rinehart, J., & Gallagher, P. G. (2012). Mutations in the mechanotransduction protein PIEZO1 are associated with hereditary xerocytosis. *Blood*, 120(9), 1908–1915. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-422253>
- ZWAAL, R. F. A., & Schroit, A. J. (n.d.). *Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells* (Vol. 89). <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/89/4/1121/1408741/1121.pdf>

## Tabelas Suplementares

### Tabela Suplementar I - Estudo de Hemoglobinas por HPLC

<b>HPLC (Variant II - <math>\beta</math> thalassemia short program):</b> Utiliza os princípios de uma cromatografia de alta resolução por troca iônica em que são usadas amostras de sangue total em EDTA, que podem ser usadas até 7 dias a 2-8°C ou 2 dias a 22-24°C
<ul style="list-style-type: none"><li>- Calibração do aparelho (fazemos diariamente com o kit comercial da máquina, uma vez que a T°C influencia as medições)</li><li>- Hemólise da amostra para obtermos as Hb's em suspensão (automaticamente na Variant II sampling station)</li><li>- A amostra hemolizada (com carga negativa) fica retida numa resina (com carga positiva)</li><li>- Tampões com um gradiente de força iônica crescente são projetados com alta pressão contra a resina, retirando as Hb's com diferentes cargas em tempos diferentes. (separação com base nas interações iônicas com o material da coluna)</li><li>- Um espectrofotômetro regista a saída das Hb's por leitura da alteração da absorvância a 415nm registando os picos.</li><li>- O <i>software</i> calcula as proporções relativas de todas as Hb's detetadas construindo um gráfico com diferentes áreas para cada pico.</li></ul>
<b>Gráficos</b> 1ºpico - (HbF) - 1.10min 2ºpico - (HbA) - 1,10 a 3,06min 3ºpico - (HbA2) - 3.6 min 4ºpico - (HbS) - 4.30 min (exemplo)
Este aparelho proporciona uma determinação da percentagem de áreas das Hemoglobinas A2 e F, bem como a separação qualitativa das hemoglobinas normais e das hemoglobinas anormais comuns. Outras variantes menos frequentes também podem atingir a eluição dentro das janelas de identificação de analitos estabelecidas pelo que para a confirmação positiva de qualquer variante de hemoglobina, poderá ser necessário efetuar a análise à cadeia de globina.

**Tabela Suplementar 2 - Doseamento Enzimático G-6-PD (glicose 6 fosfato desidrogenase)**

A G-6-PD cataliza a oxidação de glicose-6-fosfato (G-6-P) a 6-fosfogluconolactona que hidroliza espontaneamente a 6-fosfogluconato (6-PGA).			
<p style="text-align: center;">G-6-PD</p> $\text{G-6-P} + \text{NADP} \longrightarrow \text{6-PGA} + \text{NADPH} \quad (1)$ <p style="text-align: center;">A 6-P-GD cataliza a oxidação do 6-PGA a ribulose-5-fosfato e CO<sub>2</sub></p> <p style="text-align: center;">6-PGD</p> $\text{6-PGA} + \text{NADP} \longrightarrow \text{R-6-P} + \text{CO}_2 \quad (2)$			
Os ensaios de G-6-PD mais comuns medem a taxa de formação de NADPH quando o hemolisado é incubado com G-6-P (reação 1). No entanto, algum do 6-P-GA formado é posteriormente oxidado na reação 2 originando-se mais que uma mole de NADPH por mole de G-6-P oxidada. Os resultados podem ser corrigidos realizando-se 2 ensaios, num dos quais se adiciona apenas 6-PGA como substrato e, noutro, G-6-P e 6-PGA em concentrações saturantes. A actividade da G-6-PD é obtida por subtração da actividade do primeiro ensaio à do segundo			
Reagentes	Teste I (µl)	Teste II (µl)	Branco (µl)
dH <sub>2</sub> O	1420	1720	2920
Tampão (1M Tris-5mM EDTA, pH 8,0)	300	300	
NADP (2mM)	300	300	
MgCl <sub>2</sub> (0,1 m)	300	300	
G-6-P (6mM)	300	---	
6-PGA (6mM)	300	300	
- Misturar, colocar no espectrofotómetro a 30°C, aguardar 5 min e acertar a leitura a zero.			
- Correr a linha base durante ± 1 min.			
- Juntar: Hemolisado			
- Fazer correr 10-15 min e calcular a variação de A <sub>340</sub> por min nos dois ensaios ( A1) e (A2).			
- Cálculo da actividade da enzima:			
$\text{A1 } 3,0 \text{ } 100$ $\frac{6.22}{\text{Um}} \times \frac{0.08}{3.0} \times \frac{\text{HbH}}{100} = \text{6-PGD (UI/g Hb)} \quad (R1)$ $\frac{6.22}{\text{Um}} \times \frac{0.05}{0.05} \times \frac{\text{HbA}}{100} = \text{6-PGD + G6PD (UI/g Hb)} \quad (R2)$			
G-6-PD (UI/g Hb) = R2 - R1			
Gama normal = G-6-PD 5,0 - 7,1 UI/g Hb a 30°C.			
6-PGD 4,8 - 6,4 UI/g Hb a 30°C.			

**Tabela Suplementar 3 - Crioteste**

<b>Teste de criohemólise – Crioteste</b>
<p>O crioteste é um teste de hemólise fria (criohemólise) usado para o diagnóstico de esferocitose hereditária. Baseia-se na presença de alterações nas proteínas da membrana dos glóbulos vermelhos que os tornam mais suscetíveis à quebra pelo frio. Ao contrário de outros testes de triagem para esferocitose hereditária, é independente da relação superfície-volume eritrocitária. O método utilizado baseia-se na leitura da absorbância a 540nm por espectrofotometria.</p>
<b>Reagentes e Amostras</b>
<p>Use amostras de sangue em EDTA. Teste dentro de 48 horas. Utilizar amostras recolhidas e processadas nas mesmas condições para fins de controlo. Sempre que possível, utilizar uma amostra de controlo com EH. Antes de iniciar os ensaios, confirme que os reagentes necessários estão preparados e em quantidade suficiente. Caso contrário, preparar o(s) reagente(s) de acordo com o Procedimento Específico.</p>
<b>Crioteste</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Para cada amostra e controle, retirar 2 tubos de hemólise (tubos de ensaio duplicados A1 e A2) contendo 2 mL de solução-estoque tampão fosfato 50mM-0,7M sacarose do freezer -20°C e colocar na incubadora a 37°C até estabilizar a temperatura da solução.</li><li>- Identificar para cada amostra e controle: 3 tubos de hemólise 1,5 mL tubo eppendorf - Num dos tubos de hemólise, lavar as células 3 vezes com soro fisiológico gelado</li><li>- Em 1,5 mL de tubo eppendorf fazer uma suspensão de 50-70% em soro fisiológico das hemácias lavadas da seguinte forma: pipetar 100 µ L de soro fisiológico e adicionar 100 µ L de concentrado de hemácias (50% de suspensão)</li><li>- Pipetar 50 mL da suspensão de CH a 50% para cada tubo de hemólise (A1 e A2) contendo a solução estoque tampão fosfato 50 mM-Sacarose previamente aquecida a 37°C e os tubos já devidamente identificados</li><li>- Vórtice imediatamente por alguns segundos</li><li>- Incubar a 37 °C por exatos 10 minutos</li><li>- Transfira os tubos para gelo triturado e deixe repousar por exatos 10 minutos. Agite no vórtice</li><li>- Centrifugar 5 minutos para pellet de hemácias remanescentes.</li><li>- Ler as absorbâncias a 540 nm do sobrenadante (A1 e A2)</li><li>- Durante a lavagem ou incubação com soro fisiológico noutro suporte, preparar um hemolisado a 100% para cada amostra e controlar por: Pipetting 2 ml de água destilada num tubo de hemólise (2) e adição de 50 ml de sangue total. Homogeneizar</li><li>- Para outro tubo de hemólise (A3) contendo 4 mL de água destilada transferir 200 mL do tubo anterior (2) e selar com parafilme</li><li>- Homogeneizar por inversão</li><li>- Ler as absorbâncias a 540 nm da amostra e controlar (tubos de hemólise A1, A2 e A3). Calcular a % criohemólise <math>\% \text{crio-hemólise} = (\text{Média das absorvâncias A1 e A2}) / \text{abs com } 100 \% \text{ hemólise (A3)} \times 21</math></li></ul>
<b>Interpretação dos resultados</b>
<p>% criohemólise entre 3 a 15% - Negativo % criohemólise &gt;20% positiva (esferocitose hereditária)</p>

## Tabela Suplementar 4 - Sequenciação de Sanger

Preparação PCR	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identificar os tubos ependorf com nome do gene, nº amostra, nº exão (um para cada amostra + branco)</li> <li>- Agitar e homogeneizar todas as amostras, primers e multiplex (excepto taq) no vortex seguido da centrifuga</li> <li>- Os Primers (cerca de 20 nucleotídeos por primer) são sempre pipetados com pontas de filtro uma vez que são bastante voláteis (formam aerossóis) e assim evitamos contaminações</li> <li>- Fazemos uma mistura para o nº amostras + branco (ou mais 1 se forem muitas) com todos os reagentes à excepção dos DNA e dividimos pelos tubos.</li> <li>- Adicionar DNA a todos os tubos exceto branco</li> <li>- Levar ao termociclador no programa selecionado</li> </ul> <p>Volume final normalmente 13µl ou 25µl</p>	
<p>H2O destilado - 18µl  T. glicose - 2,5µl  DMSO - 2,5µl  dNTP's - 0,5µl  Primer D (10nM) - 0,5µl  Primer R (10 nM) - 0,5µl  Taq - 0,2µl  DNA - 2µl</p>	<p>H2O destilada - 4,5µl  Mix - 6,25µl  Q - 1,25µl  Primer D (10nM) - 0,5µl  Primer R (10 nM) - 0,5µl  DNA - 2µl  <b>Kit multiplex</b></p>
<p><b>Kit Multiplex®:</b> Kit comercial que contém a água, solução Mix e solução Q. Na Mix já temos a enzima. A solução Q é uma solução que otimiza a reação e o seu uso é facultativo.</p>	
Confirmação da amplificação em gel de agarose:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agarose a 2% (2gr para 100ml ou 1gr para 50 ml de gel) + 4µl corante (ou 8 µl para 100ml de gel)</li> <li>- Junta-se 4µl de DNA com corante a alica-se nos poços do gel de agarose</li> <li>- Eletroforese a 120V por 30 min</li> <li>- Verificar se aparecem as bandas de amplificação do DNA</li> </ul>	
1- Purificar os produtos de PCR	
<p>O primeiro passo é fazer uma purificação enzimática com adição de fosfatase alcalina. O objetivo é que a enzima degrade tudo o que não seja de cadeia dupla (excesso dNTP's, etc) de modo a que só reste o nosso produto de PCR amplificado</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Colocar na parede de cada poço 0.75µl da enzima (EXOSAP)</li> <li>- Colocar no fundo de cada poço 3µ do produto PCR - Fechar fila a fila para não confundir (1 fila = 1 fila de pontas de pipetas) (antes de centrifugar conseguimos observar em cada poço as duas "bolhinhas" para confirmar que não houve enganos na pipetagem)</li> <li>- Placa centrífuga - spin</li> <li>- Termociclador - Programa EXOSAP (4 min a 37°C - T°C ideal da enzima e 1 min a 80°C no final para desnaturar a enzima de modo a que esta não continue a trabalhar)</li> </ul>	
2- Reação de sequenciação	
<p>Adicionar 0.75µl de reagente de sequenciação (BigDye Terminator) em cada poço  Usamos um Sequencing Kit, que é composto já com a mistura do tampão, MgCl, enzimas, dNTP's, etc.)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Adicionar 0.5µl do Primer correspondente em cada poço (ponteiros com filtro) e homogeneizar com a própria pipeta- homogeneizar também o primer primeiro com o dedo (usamos apenas um primer, direto ou reverso, uma vez que aqui já temos a nossa zona amplificada)</li> <li>- Placa centrífuga - spin</li> <li>- Termociclador - Programa sequenci (desnaturação, annealing 50°C durante 5'', extensão a 60°C , polimerase com t°C óptima a 60°C , 24 ciclos)</li> </ul>	
3- Purificação	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Retirar uma placa de resina do frigorífico e centrifugar para retirar o líquido (programa 4 da centrífuga - 900g por 10 minutos) - descartar o líquido</li> <li>- Colocar em cima da nova placa (sala dos NGS) e passar as amostras para a placa de purificação utilizando a pipeta multicanal (10µl) com cuidado de não furar a resina (Colocam-se aqui as amostras do Licínio que já vêm com reação de sequenciação)</li> <li>- Centrifugar novamente (900g por 6 minutos)</li> </ul>	

- Adicionar 5µl de formamida (para não evaporar) com pipeta de repetição (sem encostar)
- Colocar no equipamento

**Notas:** Quando os fragmentos são muito grandes, pode ser necessário utilizar mais do que 1 Primer (como se fossem duas reações) uma vez que um primer consegue ler até cerca de 500 a 600 pb.

**Tabela Suplementar 5 - Reações de PCR para cada gene/exão e respectivos primers utilizados**

<b>ANK1</b>	
<b>Exão 4/5</b>	<b>Exão 10</b>
H2O destilada - 21 $\mu$ l T. glicose - 2,5 $\mu$ l DMSO - 0 $\mu$ l DNTP's - 0,5 $\mu$ l Primer D (10nM) - 0,5 $\mu$ l Primer R (10 nM) - 0,5 $\mu$ l Taq - 0,2 $\mu$ l DNA - 2 $\mu$ l	H2O destilada - 21 $\mu$ l T. glicose - 2,5 $\mu$ l DMSO - 0 $\mu$ l DNTP's - 0,5 $\mu$ l Primer D (10nM) - 0,5 $\mu$ l Primer R (10 nM) - 0,5 $\mu$ l Taq - 0,2 $\mu$ l DNA - 2 $\mu$
TA (temperatura de annealing): 58°C 998 pb	TA: 56°C 419 pb
Primers: ANK1-4D 5' – TCCACAGACCTTTGCTGG – 3' ANK1-5R 5' – TAGTCCCTTGCAGAACCTG – 3' Para sequenciar: 4D ANK1-10D 5' – AGGGAAGAAGTAGGGAGTGA – 3' ANK1-10R 5' – CAGGCCTCGAATCTGGG – 3' Para sequenciar: 10D	

<b>SPTB</b>		
<b>Exão 3</b>	<b>Exão 11</b>	<b>Exão 27</b>
dH2O - 4,5 $\mu$ l Mistura - 6.25 $\mu$ l Q - 1,25 $\mu$ l Primer D (3D) - 0,5 $\mu$ l Primer R (3R) - 0,5 $\mu$ l DNA - 2 $\mu$ l Kit multiplex	dH2O - 21 $\mu$ l T. glicose - 2,5 $\mu$ l DMSO - 0 $\mu$ l DNTP's - 0,5 $\mu$ l Primer D (10nM) - 0,5 $\mu$ l Primer R (10 nM) - 0,5 $\mu$ l Taq - 0,2 $\mu$ l DNA - 2 $\mu$	dH2O- 21 $\mu$ l T. glicose - 2,5 $\mu$ l DMSO - 0 $\mu$ l DNTP's - 0,5 $\mu$ l Primer D (10nM) - 0,5 $\mu$ l Primer R (10 nM) - 0,5 $\mu$ l Taq - 0,2 $\mu$ l DNA - 2 $\mu$
TA: 60°C 391	TA: 56°C 740 pb	TA: 60°C 421 pb
Primers:		



SPTB-3D 5' - TGTCACACTGACCCTGCCAA - 3'

SPTB-3R 5' - GAAAACCTGGGAAGGCCAGGA - 3'; Para sequenciar 3D

SPTB-11D2 5' - CAAGAGCATCAGGCTGTAC - 3'

SPTB-11R2 5' - CTCCCCAGATGCAAATCTTG - 3'; Para sequenciar: 11R2

SPTB-27D 5' - TTCCAGTCCTAGGCCCA - 3'

SPTB-27R 5' - TCCAGGACTGTCCCTTCA - 3'; Para sequenciar: 27D

<b>SLC4A1</b>		
<b>Exão 7/9</b>	<b>Exão 10/13</b>	<b>Exão 14/15</b>
dH <sub>2</sub> O - 18,5µ l	dH <sub>2</sub> O - 21µ l	dH <sub>2</sub> O - 18,5µ l
T. Glic - 2,5µ l	T. Glic - 2,5µ l	T. Glic - 2,5µ l
DMSO - 2,5µ l	DMSO - 5µ l	DMSO - 2,5µ l
dNTP's - 0,5µ l	dNTP's - 0,5µ l	dNTP's - 0,5µ l
Primer D (7D) - 0,5µ l	Primer D (7D) - 0,5µ l	Primer D (7D) - 0,5µ l
Primer R (9R) - 0,5µ l	Primer R (9R) - 0,5µ l	Primer R (9R) - 0,5µ l
Taq - 0,2µ l	Taq - 0,2µ l	Taq - 0,2µ l
DNA - 2µ l	DNA - 2µ l	DNA - 2µ l
TA: 58°C 825 pb	TA: 64°C 1457 pb	TA: 60°C 695 pb
<b>Primers:</b> B3-7D 5'CTCAGCCTGAACAGCTTACTCA 3'* B3-7R 5'GCGTTTGAGAAAGCTCTCTCCT 3' B3-8D 5'GTCAGACTGGCCCCGAGGACT 3'* B3-8R 5'GAGCCAAGACACGAGGGGTG 3' B3-9D 5'ACCCTGGGCTCCTCGGCCT 3'* B3-9R 5'GCAGGTCCCAAGCTTCCCCA 3' B3-10D 5'GGTCCTTTCCCTCCGCAGGT 3' B3-10R 5'AGAGGCTACGCTGAGGTGTCT 3'* B3-11D 5'TCCTCCAGCTACTCCCTCTGA 3'*		B3-11R 5'CAGAGGGTCAGAGGCAAGAGT 3' B3-12D 5'CCTGGAAATGATCTCCTGACCT 3'* B3-12R 5'ACCATGCATCAGGCAGGTGGT 3' B3-13D 5'CCTTGCCCCAAGGCCCTTTGA 3'* B3-13R 5'TGATCTCGGGTGATCCACCT 3' B3-14D 5'CCAAGCCAAAGCTGGGAGAGA 3' B3-14R 5'GGGCTGGGATAGGGCAGTGT 3' B3-15D 5'GGGGAGTGACTGGGCACTGA 3'* B3-15R 5'ATGAGGACCTGGGGGGTATCA 3' Para sequenciar primers marcados com *

<b>SPTAI</b>			
<b>Lely (intrão 39/exão 40)</b>	<b>Lely (intrão 45/exão 46)</b>	<b>Prague (intrão 36/exão 37)</b>	<b>Lepra (intrão 30/exão 31)</b>
dH <sub>2</sub> O - 4,5µ l Mistura - 6.25µ l Q - 1,25µ l Primer D (A) - 0,5µ l Primer R (B) - 0,5µ l DNA - 2µ l (Kit multiplex)	dH <sub>2</sub> O - 4,5µ l Mistura - 6.25µ l Q - 1,25µ l Primer D (C'D) - 0,5µ l Primer R (D) - 0,5µ l DNA - 2µ l (Kit multiplex)	dH <sub>2</sub> O - 4,5µ l Mistura - 6.25µ l Q - 1,25µ l Primer D (sa41) - 0,5µ l Primer R (sa18) - 0,5µ l DNA - 2µ l (Kit multiplex)	dH <sub>2</sub> O - 4,5µ l Mistura - 6.25µ l Q - 1,25µ l Primer D (sa55) - 0,5µ l Primer R (sa10) - 0,5µ l DNA - 2µ l (Kit multiplex)
TA: 56°C 194 pb	TA: 56°C 658 pb	TA: 60°C 148 pb	TA:60 567 pb
<p><b>Primers:</b></p> <p>SPTAI A (intrão 39) 5' - CGTGAGTCTGAATATGAGTG - 3'</p> <p>SPTAI B (exão 40) 5' - GTGAGCTAGTTCAGAATTCC -3'; Para sequenciar: A</p> <p>SPTA C'D (intrão 45) 5' - CAGTGGGTGGACAGATTCAT - 3'</p> <p>SPTA D (exão 47) 5' - ACTCTGGAATCTCAGCTGGA - 3'; Para sequenciar: C'D</p> <p>SA55 (intrão 30) 5' - GACCTCAAGTGATCTACCT - 3'</p> <p>SA10 (exão 31) 5' - CCTGTCTAGTACACGTTGGA - 3'; Para sequenciar: SA55</p> <p>SA41 (intrão 36) 5' - AAGCTATTGCTGTAGGATGAC - 3'</p> <p>SA18 (exão 37) 5' - GGATGGCAGGCTCATGGG - 3'; Para sequenciar: SA41</p>			

<b>Exão 28/29</b>	<b>Exão 32/33</b>	<b>Exão 45</b>
dH <sub>2</sub> O - 21µ l T. Glic - 2,5µ l DMSO - 0µ l dNTP's - 0,5µ l Primer D-28D (10nM) - 0,5µ l Primer R-29R (10nM)- 0,5µ l Taq - 0,2µ l	dH <sub>2</sub> O - 4,5µ l Mix - 6.25µ l Q - 1,25µ l Primer D (32D) - 0,5µ l Primer R (33R) - 0,5µ l DNA - 2µ l (Kit multiplex)	dH <sub>2</sub> O - 4,5µ l Mix - 6.25µ l Q - 1,25µ l Primer D (45D) - 0,5µ l Primer R (45R) - 0,5µ l DNA - 2µ l (Kit multiplex)

DNA - 2 $\mu$		
TA: 60°C 610 pb	TA: 60°C 722 pb	TA: 60°C 148 pb
<p><b>Primers:</b></p> <p>SPTA1-28D 5' - TGGAAAACCTGTAGGACAAACAG - 3'</p> <p>SPTA1-29R 5' - AGAGATGAGCTCCCTTTGTG - 3'; Para sequenciar:28D</p> <p>SPTA1-32D 5' - GTGAGAAGAAAAGAGGCATGT - 3'</p> <p>SPTA1-33R 5' - TGATTCCTCTTCATGTGACTTTG - 3'; Para sequenciar:32D</p> <p>SPTA1-45D 5' - TGCAGTTAAGCCTACAAACC - 3'</p> <p>SPTA1-45R 5' - AGTCTCTCCTCTTCCCTTCA - 3; Para sequenciar:45R</p>		

<b>PIEZO1</b>	<b>EPB41</b>
<b>Exão 51</b>	<b>Exão 10</b>
H2O destilada - 4,5 $\mu$ l Mix - 6.25 $\mu$ l Q - 1,25 $\mu$ l Primer D-50D (10nM) - 0,5 $\mu$ l Primer R-52D2 (10 nM) - 0,5 $\mu$ l DNA - 2 $\mu$ l <b>Kit multiplex</b>	dH2O - 21 $\mu$ l T. Glic - 2,5 $\mu$ l DMSO - 0 $\mu$ l dNTP's - 0,5 $\mu$ l Primer D-10D (10nM) - 0,5 $\mu$ l Primer R-10R (10nM)- 0,5 $\mu$ l Taq - 0,2 $\mu$ l DNA - 2 $\mu$
TA: 64°C 728 pb	TA: 60°C 567 pb
<p><b>Primers:</b></p> <p>PIEZO1 -50D- 5'- GGGTTGGGGGAGGCTA -3'</p> <p>PIEZO1- 51D2- 5'- GCCCCAGGACTCACCA-3': Para sequenciar: 50D</p> <p>EPB41-10D- 5' - TGCTCTCCAGGAAGTCATG - 3'</p> <p>EPB41-10R- 5' - GCATCACAGGACTGATCAAC - 3': Para sequenciar: 9D</p>	

<b>Programa do Termociclador</b>
Multiplex: Passo inicial 95°C/5 min para ativar a enzima
Cerca de 30'' de tempo de extensão por cada 500 pb
Podemos escolher um programa com gradiente de Temperatura