

## **IV. Resultados**



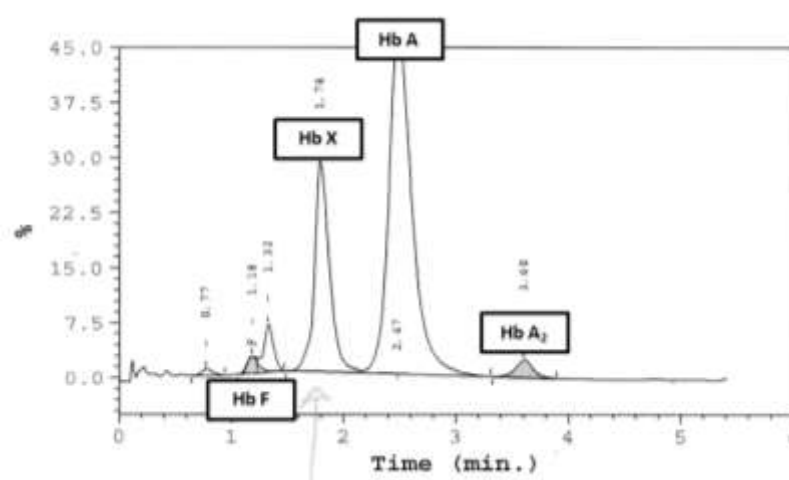
## 1. VARIANTES DESCRITAS

### 1.1. CASO CLÍNICO 1

Indivíduo I

#### 1.1.1. ESTUDO DAS HBS

A quantificação das Hbs presentes, por HPLC de troca catiónica, revelou níveis de Hb A<sub>2</sub> normais (2.4%), níveis de Hb F ligeiramente aumentados (1.7%) e a presença de um pico desconhecido (25.8%) que poderia corresponder a uma variante de Hb (Hb X). Esta apresentou um tempo de retenção similar ao tempo de retenção da Hb A<sub>1c</sub> (Hb glicosilada). O indivíduo apresentou o perfil AXA<sub>2</sub> (Figura 8).

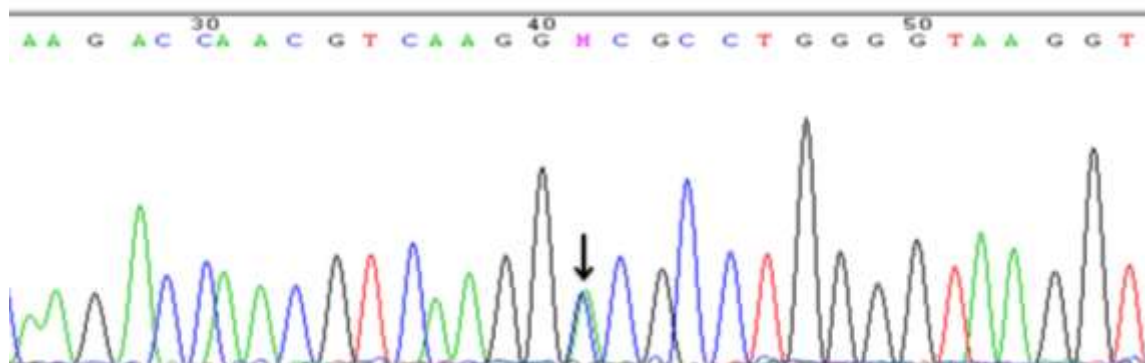


**Figura 8:** Separação das Hbs do indivíduo I por HPLC de troca catiónica.

#### 1.1.2. ESTUDOS MOLECULARES

A sequenciação de ADN mostrou a presença da alteração GCC > GAC no codão 12 do gene  $\alpha 2$  (Figura 9). Esta alteração, presente em heterozigotia, resulta na síntese de um

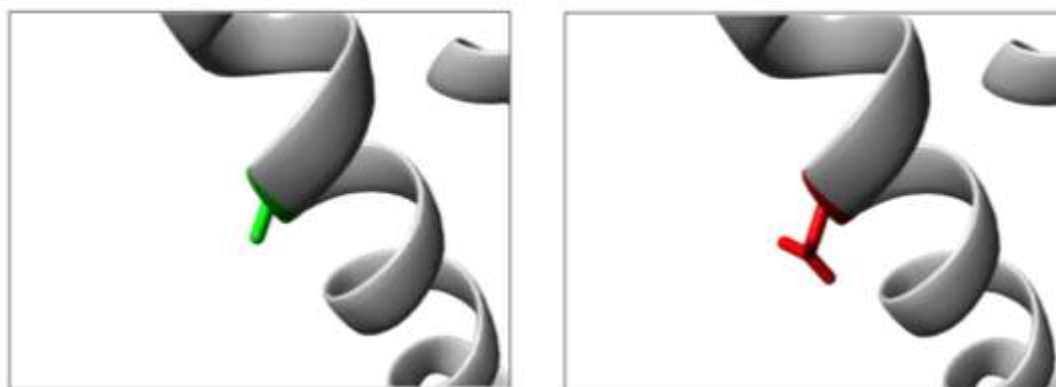
ácido aspártico em vez de uma alanina (Ala → Asp). O gene  $\alpha 1$  não apresentou qualquer alteração. O indivíduo apresentou o genótipo  $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$ .



**Figura 9:** Sequenciação do gene  $\alpha 2$  do indivíduo I. A seta indica a localização da alteração  $\text{GCC} > \text{GAC}$  no codão 12, em heterozigotia.

### 1.1.3. ESTUDOS *IN SILICO*

Os *softwares* SIFT e Polyphen-2 calcularam os seguintes *scores* 0.00 e 0.02, respetivamente. O SIFT prediz que a mutação afeta a função da Hb. Já o PolyPhen-2 prediz o oposto, ou seja que a mutação não afeta a função da Hb.



**Figura 10:** Representação das diferenças estruturais entre os aminoácidos alanina (colorido a verde) e ácido aspártico (colorido a vermelho). Imagens obtidas pelo *software* HOPE.

## 1.2. CASO CLÍNICO 2

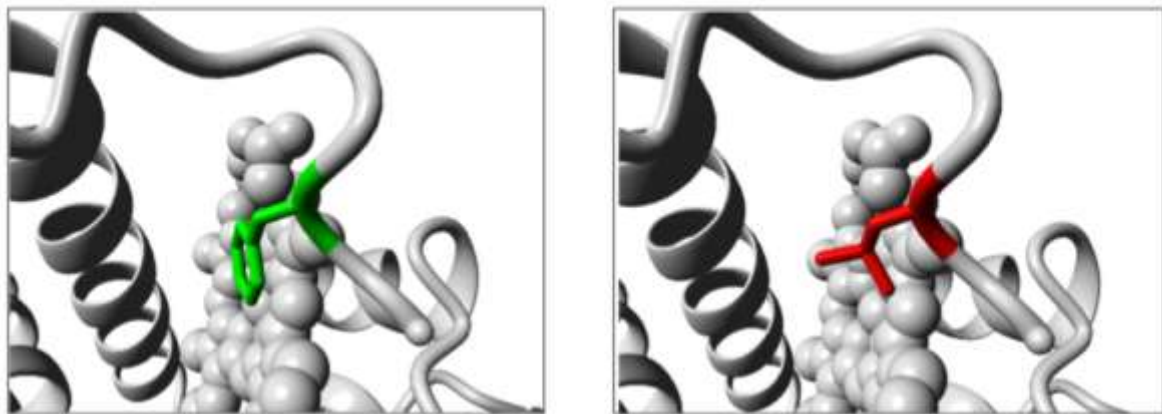
Indivíduo II

### 1.2.1. ESTUDOS MOLECULARES

A sequenciação de ADN mostrou a presença da alteração  $TTC > TTG$  no codão 43 do gene  $\alpha 2$ . Esta alteração, presente em heterozigotia, resulta na síntese de uma leucina em vez de uma fenilalanina ( $Phe \rightarrow Leu$ ). O gene  $\alpha 1$  não apresentou qualquer alteração. O indivíduo apresentou o genótipo  $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$ .

### 1.2.2. ESTUDOS *IN SILICO*

Os *softwares* SIFT e Polyphen-2 calcularam os seguintes *scores* 0.00 e 0.969 respetivamente, predizendo que a mutação afeta a função da Hb.



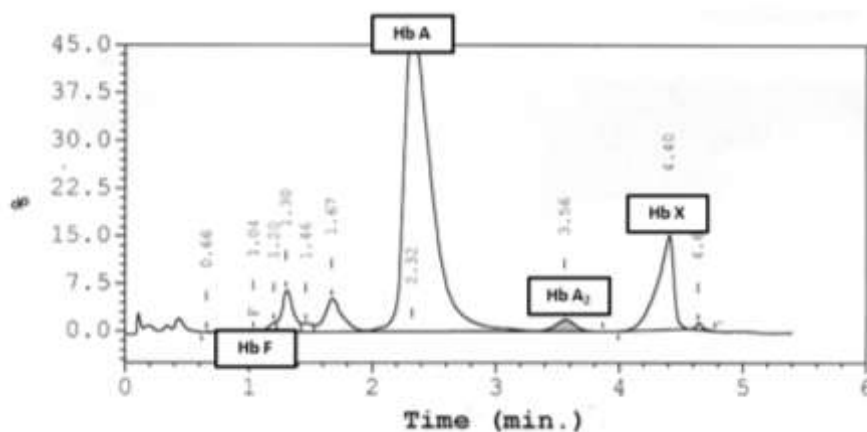
**Figura 11:** Representação das diferenças estruturais entre os aminoácidos fenilalanina (colorido a verde) e leucina (colorido a vermelho). Imagens obtidas pelo *software* HOPE.

### 1.3. Caso clínico 3

Indivíduo III

#### 1.3.1. ESTUDO DAS HBS

A quantificação das Hbs presentes, por HPLC de troca catiónica, revelou níveis de Hb A<sub>2</sub> ligeiramente reduzidos (1.8%), níveis de Hb F normais (0.1%) e a presença de um pico desconhecido (13.7%) que poderia corresponder a uma variante de Hb. Esta apresentou um tempo de retenção igual ao tempo de retenção para Hb S. O indivíduo III apresentou o perfil AXA<sub>2</sub> (Figura 12).



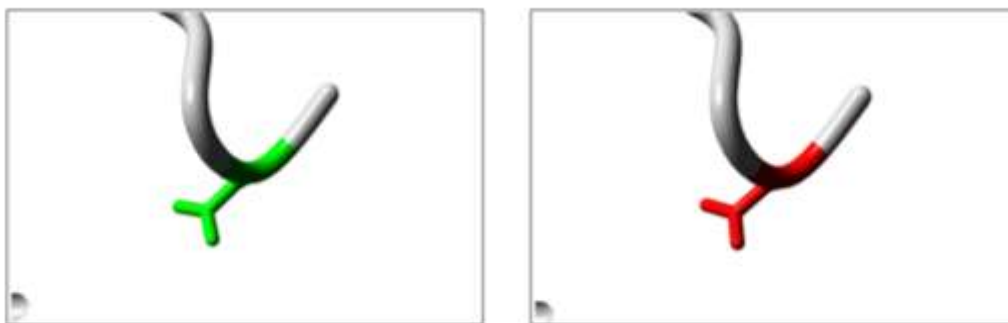
**Figura 12:** Separação das Hbs do indivíduo III por HPLC de troca catiónica.

#### 1.3.2. ESTUDOS MOLECULARES

A sequenciação de ADN mostrou a presença da alteração GAC > AAC no codão 74 do gene  $\alpha 2$ . Esta alteração, presente em heterozigotia, resulta na síntese de uma asparagina em vez de um ácido aspártico (Asp  $\rightarrow$  Asn). O gene  $\alpha 1$  não apresentou qualquer alteração. O indivíduo apresentou o genótipo  $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$ .

### 1.3.3 ESTUDOS *IN SILICO*

Os *softwares* SIFT e Polyphen-2 calcularam os seguintes *scores* 0.03 e 0.134, respectivamente. O SIFT prediz que a mutação afeta a função da Hb. Já o PolyPhen-2 prediz o oposto, ou seja que a mutação não afeta a função da Hb.



**Figura 13:** Representação das diferenças estruturais entre os aminoácidos ácido aspártico (colorido a verde) e asparagina (colorido a vermelho). Imagens obtidas pelo *software* HOPE.

#### 1.4. CASO CLÍNICO 4

Indivíduos IV-1, IV-2, IV-3 e IV-4

Foram estudados quatro indivíduos, da mesma família. O indivíduo IV-1 apresentou um valor de HGM inferior aos valores de referência (hipocromia). Os indivíduos IV-2 e IV-3 apresentaram valores de Hb, VGM e HGM inferiores aos valores de referência (anemia microcítica e hipocrômica), verificando-se uma redução mais acentuada no indivíduo IV-2. Por último, o indivíduo IV-4 apresentou valores de VGM e HGM abaixo dos valores de referência (microcitose e hipocromia) (Tabela 4).

**Tabela 4:** Parâmetros hematológicos apresentados pelos indivíduos IV-1, IV-2, IV-3 e IV-4.

Indivíduos	IV-1	IV-2	IV-3	IV-4
Género	F	F	M	M
RBC ( $10^{12}/L$ )	4.72	4.41	4.79	5.16
Hb (g/dL)	12.3	9.7	12.5	13
VGM (fL)	80	70.5	79	77
HGM (pg)	26	22	26	25

##### 1.4.1. ESTUDO DAS HBS

A quantificação das Hbs dos indivíduos IV-1, IV-3 e IV-4, por HPLC de troca catiónica, revelou níveis de Hb F normais e níveis de Hb A<sub>2</sub> elevados (superiores a 20%), indicando a provável presença de uma variante de Hb com um tempo de retenção igual ao da Hb A<sub>2</sub>. Os níveis de Hb F e Hb A<sub>2</sub> para o indivíduo IV-2 encontravam-se normais (Tabela 5).



**Tabela 5:** Níveis de Hb A<sub>2</sub> e Hb F dos indivíduos IV-1, IV-2, IV-3 e IV-4, obtidos por HPLC de troca catiónica.

Indivíduos	IV-1	IV-2	IV-3	IV-4
Hb A <sub>2</sub>	+ Hb X=27%	2.8	+ Hb X=21%	+ Hb X=27%
Hb F	0.4	0.3	0.5	0.4
Perfil no HPLC	AXA <sub>2</sub>	AA <sub>2</sub>	AXA <sub>2</sub>	AXA <sub>2</sub>

#### 1.4.2. ESTUDOS MOLECULARES

O estudo da presença das deleções mais frequentes,  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$ , por Gap-PCR multiplex, revelou a presença de  $-\alpha^{3.7}$  em heterozigotia nos indivíduos IV-1 e IV-4 e a presença de  $-\alpha^{3.7}$  em homozigotia no indivíduo IV-2. O indivíduo IV-3 não apresentou nenhuma das deleções. O estudo da presença de grandes deleções por MLPA revelou a ausência destas em todos os indivíduos.

A sequenciação de ADN mostrou a presença da alteração  $\underline{C}CC > \underline{C}AC$  no codão 77 do gene  $\alpha 2$ , para os indivíduos IV-1, IV-3 e IV-4. Esta alteração, presente em heterozigotia, resulta na síntese de uma histidina em vez de uma prolina (Pro  $\rightarrow$  His). O gene  $\alpha 1$  não apresentou qualquer alteração.

Os genótipos apresentados pelos indivíduos IV-1, IV-2, IV-3 e IV-4 foram,  $-\alpha^{3.7}/\alpha^T\alpha$ ,  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ,  $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$  e  $-\alpha^{3.7}/\alpha^T\alpha$ , respetivamente.

### 1.4.3. ESTUDOS *IN SILICO*

Os *softwares* SIFT e Polyphen-2 calcularam os seguintes *scores* 0.01 e 0.047, respetivamente. O SIFT prediz que a mutação afeta a função da Hb. Já o PolyPhen-2 prediz o oposto, ou seja que a mutação não afeta a função da Hb.



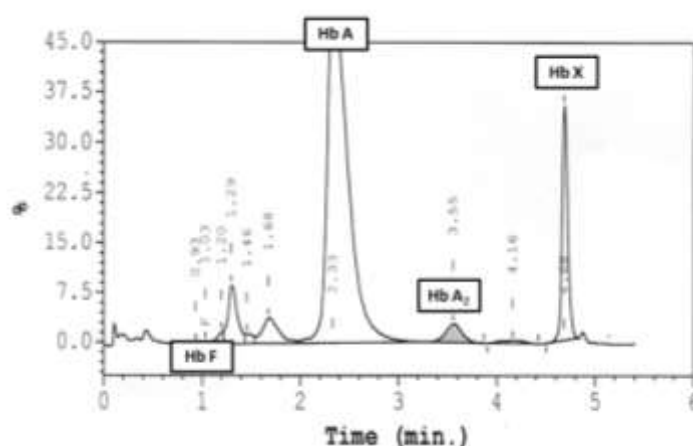
**Figura 14:** Representação das diferenças estruturais entre os aminoácidos prolina (colorido a verde) e histidina (colorido a vermelho). Imagens obtidas pelo *software* HOPE.

## 1.5. CASO CLÍNICO 5

Indivíduo V

### 1.5.1. ESTUDO DAS HBS

A quantificação das Hbs presentes, por HPLC de troca catiónica, revelou níveis de Hb A<sub>2</sub> (2.8%) e níveis de Hb F normais (0.8%) e a presença de um pico desconhecido (13.7%), que poderia corresponder a uma variante de Hb. Esta apresentou um tempo de retenção superior ao tempo de retenção da Hb A<sub>2</sub>. O indivíduo V apresentou o perfil AXA<sub>2</sub> (Figura 15).



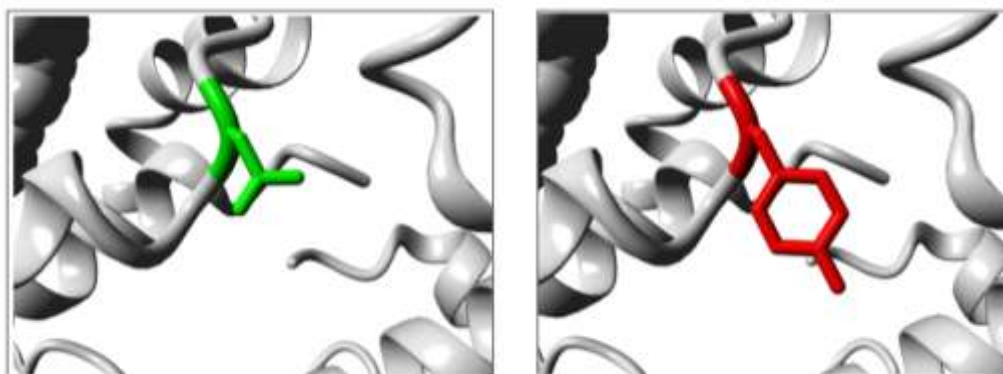
**Figura 15:** Separação das Hbs do indivíduo V, por HPLC de troca catiónica.

### 1.5.2. ESTUDOS MOLECULARES

A sequenciação de ADN mostrou a presença da alteração GAC > TAC no codão 94 do gene  $\alpha 2$ . Esta alteração, presente em heterozigotia, resulta na síntese de uma tirosina em vez de um ácido aspártico (Asp  $\rightarrow$  Tyr). O gene  $\alpha 1$  não apresentou qualquer alteração. O indivíduo apresentou o genótipo  $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$ .

### 1.5.2. ESTUDOS *IN SILICO*

Os *softwares* SIFT e Polyphen-2 calcularam os seguintes *scores* 0.00 e 1.00, respetivamente. Ambos predizem que a mutação afeta a função da Hb.



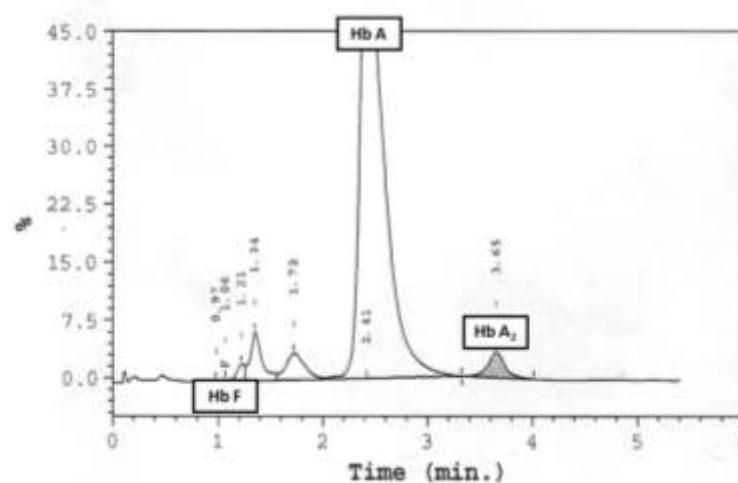
**Figura 16:** Representação das diferenças estruturais entre os aminoácidos ácido aspártico (colorido a verde) e tirosina (colorido a vermelho). Imagens obtidas pelo *software* HOPE.

## 1.6. CASO CLÍNICO 6

Indivíduo VI

### 1.6.1. ESTUDO DAS HBS

A quantificação das Hbs presentes, por HPLC de troca catiónica, revelou níveis de Hb A<sub>2</sub> (3.3%) e níveis de Hb F normais (0.2%) e a ausência de picos anormais. O indivíduo VI apresentou o perfil AA<sub>2</sub> (Figura 17).



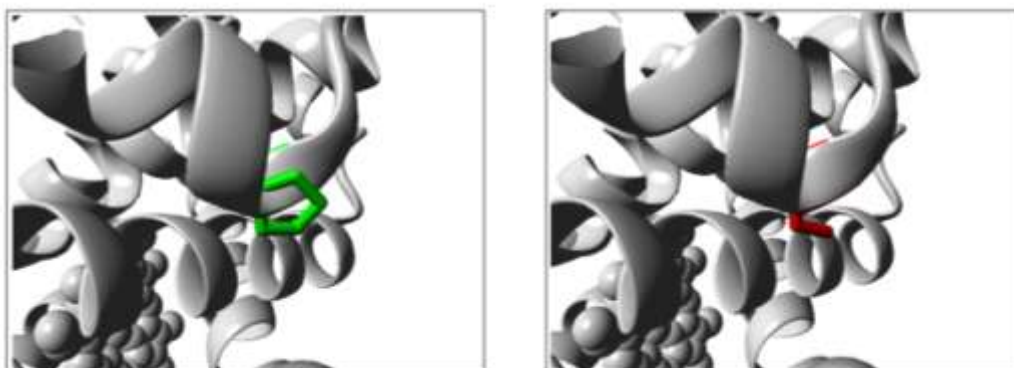
**Figura 17:** Separação das Hbs do indivíduo VI por HPLC de troca catiónica.

### 1.6.2. ESTUDOS MOLECULARES

A sequenciação de ADN mostrou a presença da alteração CCT > TCT no codão 119 do gene  $\alpha 1$ . Esta alteração, presente em heterozigotia, resulta na síntese de uma serina em vez de uma prolina (Pro  $\rightarrow$  Ser). O gene  $\alpha 2$  não apresentou qualquer alteração. O indivíduo apresentou o genótipo  $\alpha\alpha^T/\alpha\alpha$ .

### 1.6.3. ESTUDOS *IN SILICO*

Os *softwares* SIFT e Polyphen-2 calcularam os seguintes *scores* 0.00 e 0.718, respetivamente. Ambos predizem que a mutação afeta a função da Hb



**Figura 18:** Representação das diferenças estruturais entre os aminoácidos prolina (colorido a verde) e serina (colorido a vermelho). Imagens obtidas pelo *software* HOPE.

## 1.7. CASO CLÍNICO 7

### Indivíduos VII-1 a VII-23

Foram estudados no total 308 indivíduos com microcitose e hipocromia persistente, de forma a clarificar a origem da mesma.

#### 1.7.1. ESTUDOS MOLECULARES

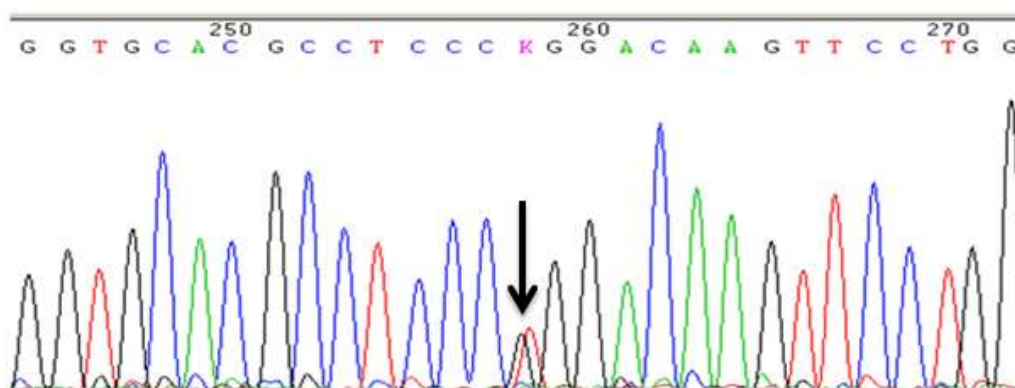
O estudo das deleções mais frequentes,  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$ , por Gap-PCR multiplex, revelou a presença de  $-\alpha^{3.7}$  em heterozigotia em 119 indivíduos,  $-\alpha^{3.7}$  em homozigotia em 30 indivíduos,  $-\alpha^{4.2}$  em heterozigotia em 13 indivíduos,  $-\alpha^{4.2}$  em homozigotia em 1 indivíduo e a presença de ambas as deleções em 3 indivíduos (Tabela 6).

A sequenciação de ADN mostrou a presença da alteração  $\text{CTG} > \text{CGG}$  no codão 125 do gene  $\alpha 2$ , em 23 indivíduos (VII-1 a VII-23) (Figura 19). Esta alteração, presente em heterozigotia, resulta na síntese de uma arginina em vez de uma leucina ( $\text{Leu} \rightarrow \text{Arg}$ ). O gene  $\alpha 1$  não apresentou qualquer alteração. Os indivíduos apresentaram o genótipo  $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$ .

Os restantes 119 indivíduos não apresentaram qualquer alteração nos seus genes  $\alpha$ -globínicos.

**Tabela 6:** Parâmetros hematológicos apresentados pelos indivíduos VII-1 a VII-23.

Indivíduos	VII-1 a VII-12	VII-13 a VII-23
<b>Género</b>	F	M
<b>RBC (<math>10^6/L</math>)</b>	5.36 – 5.95	5.64 – 6.19
<b>Hb (g/dL)</b>	12.5 – 15.2	13.1 - 15.9
<b>VGM (fL)</b>	70.6 – 79.1	73.4 – 81.4
<b>HGM (pg)</b>	23 – 25.6	23.1 – 24.8
<b>Reticulócitos (%)</b>	0.74 – 2.03	0.5 – 1.57



**Figura 19:** Sequenciação do gene  $\alpha 2$  de um indivíduo VII. A seta indica a localização da alteração  $CTG > CGG$  no codão 125, em heterozigotia.

**Tabela 7:** Número de indivíduos estudados (e percentagem) que apresentaram os seguintes genótipos,  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ,  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ ,  $-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$ ,  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$  e  $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$ .

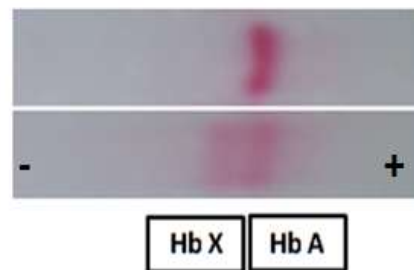
Genótipo	Número de indivíduos	Percentagem (%)
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	119	38.64
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	30	9.74
$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	13	4.22
$-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$	1	0.32
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$	3	0.97
$\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$	23	7.47
<b>Total de indivíduos estudados</b>	<b>308</b>	<b>100</b>



### 1.7.2. ESTUDO DAS HBS DOS INDIVÍDUOS COM O GENÓTIPO $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$

A quantificação das Hbs presentes, por HPLC de troca catiónica, revelou níveis de Hb A<sub>2</sub> e níveis de Hb F normais e a ausência de picos anormais para todos os indivíduos. Os indivíduos apresentaram o perfil AA<sub>2</sub>.

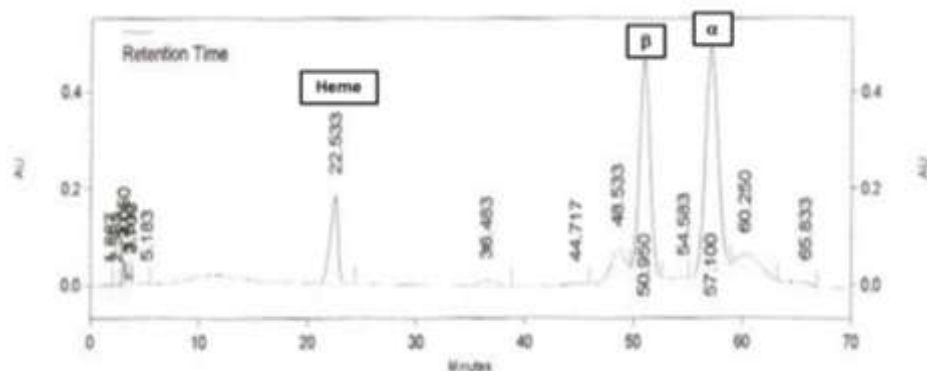
A separação das Hbs por eletroforese de acetato de celulose revelou a presença de Hb A e de uma banda desconhecida que poderia corresponder a uma variante de Hb (Figura 20). Verificou-se que a Hb X migra mais lentamente que a Hb A.



**Figura 20:** Separação das Hbs de um indivíduo controle normal (imagem superior) e de um indivíduo VII (imagem inferior), por eletroforese em acetato de celulose.

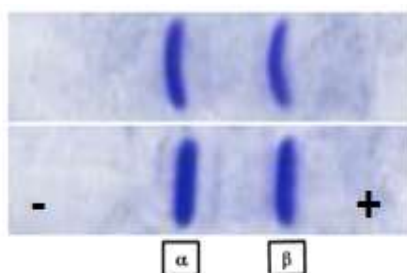
### 1.7.3. ESTUDO DAS CADEIAS GLOBÍNICAS DOS INDIVÍDUOS COM O GENÓTIPO $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$

A separação das cadeias globínicas por HPLC de fase reversa revelou a presença de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ -globínicas nas seguintes percentagens, 42.85% e 34.03%, respetivamente. O rácio de síntese das cadeias  $\alpha/\beta$ -globínicas mostrou ser 1.26. Adicionalmente o HPLC revelou a ausência de picos anormais (Figura 21).



**Figura 21:** Separação das cadeias globínicas de um indivíduo VII, por HPLC de fase reversa.

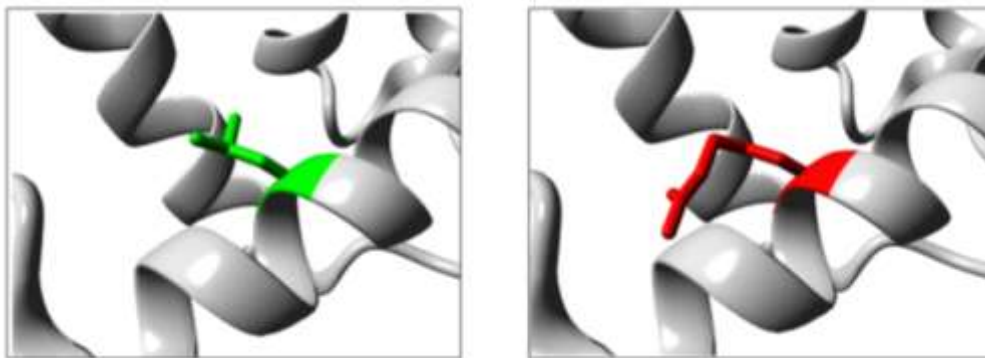
A separação das cadeias globínicas por AUT-PAGE revelou a presença de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ -globínicas normais e a ausência de bandas correspondentes a cadeias globínicas mutadas (Figura 22).



**Figura 22:** Separação das cadeias globínicas de um indivíduo controlo (imagem superior) e de um indivíduo VII (imagem inferior), por AUT-PAGE.

#### 1.7.4. ESTUDOS *IN SILICO*

Os *softwares* SIFT e Polyphen-2 calcularam os seguintes *scores* 0.00 e 1.00, respetivamente, para a mutação pontual. Ambos predizem que a mutação afeta a função da Hb.



**Figura 23:** Representação das diferenças estruturais entre os aminoácidos leucina (colorido a verde) e arginina (colorido a vermelho). Imagens obtidas pelo *software* HOPE.

## 1.8 CASO CLÍNICO 8

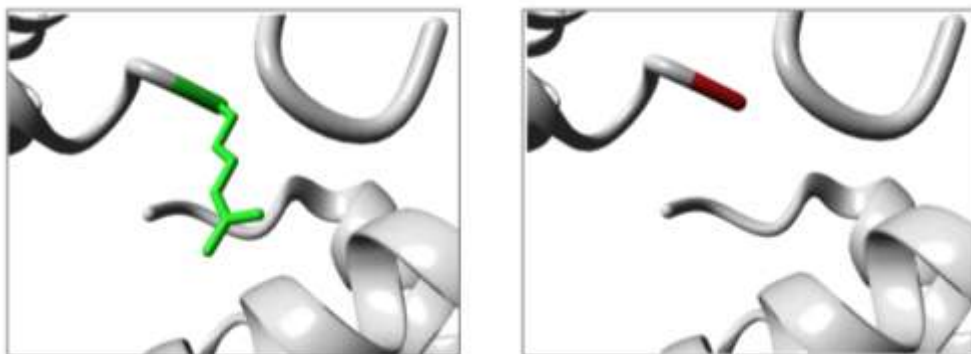
Indivíduo VIII

### 1.8.1 ESTUDOS MOLECULARES

A sequenciação de ADN mostrou a presença da alteração CGT > GGT no codão 141 do gene  $\alpha 2$ , do indivíduo VIII. Esta alteração, presente em heterozigotia, resulta na síntese de uma glicina em vez de uma arginina (Arg  $\rightarrow$  Gly). O gene  $\alpha 1$  não apresentou qualquer alteração. O indivíduo apresentou o genótipo  $\alpha\alpha^T/\alpha\alpha$ .

### 1.8.2 ESTUDOS *IN SILICO*

Os *softwares* SIFT e Polyphen-2 calcularam os seguintes *scores* 0.00 e 1.00, respetivamente. Ambos predizem que a mutação afeta a função da Hb.



**Figura 24:** Representação das diferenças estruturais entre os aminoácidos arginina (colorido a verde) e glicina (colorido a vermelho). Imagens obtidas pelo *software* HOPE.

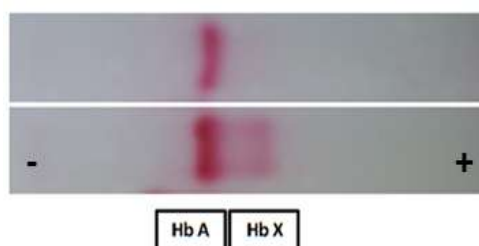
## 2. VARIANTES NÃO DESCRITAS

### 2.1. CASO CLÍNICO 9

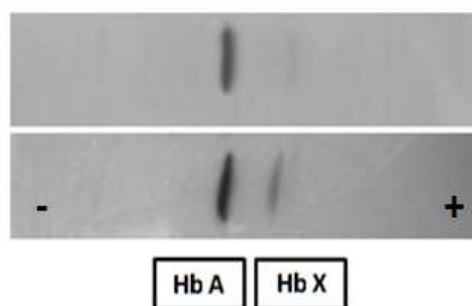
Indivíduo IX

#### 2.1.1. ESTUDO DAS HBS

A separação das Hbs por eletroforese de acetato de celulose (Figura 25) e IEF (Figura 26) revelaram em ambos os casos a presença de Hb A e de uma banda que poderia corresponder a uma variante de Hb, em menores quantidades. Em ambas as técnicas verificou-se que a Hb X migra mais rápido que a Hb A.



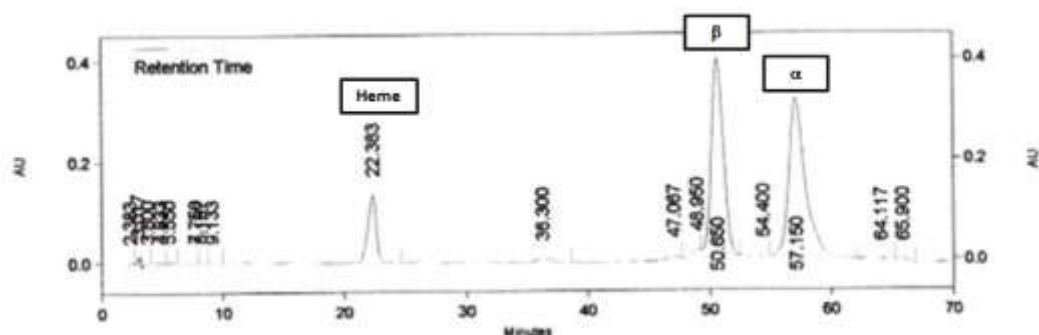
**Figura 25:** Separação das Hbs de um indivíduo controle (imagem superior) e do indivíduo IX (imagem inferior) por eletroforese em acetato de celulose.



**Figura 26:** Separação das Hbs de um indivíduo controle (imagem superior) e do indivíduo IX (imagem inferior) por IEF.

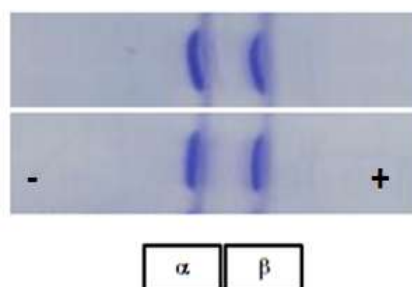
### 2.1.2. ESTUDO DAS CADEIAS GLOBÍNICAS

A separação das cadeias globínicas por HPLC de fase reversa revelou a presença de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ -globínicas em percentagens similares, 46.63% e 40.11%, respetivamente. O rácio de síntese das cadeias  $\alpha/\beta$ -globínicas mostrou ser 1.16. O HPLC revelou também a ausência de picos anormais (Figura 27).



**Figura 27:** Separação das cadeias globínicas do indivíduo IX, por HPLC de fase reversa.

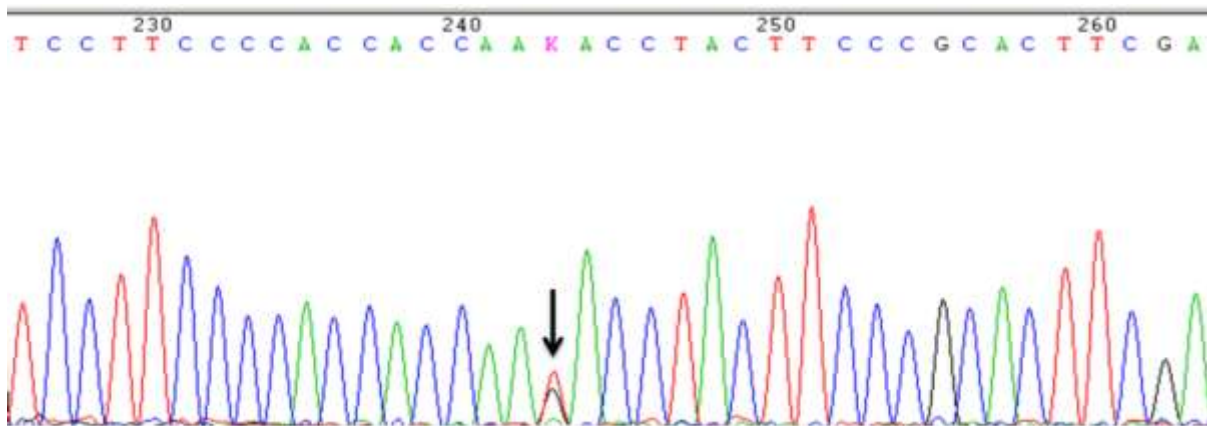
A separação das cadeias globínicas por AUT-PAGE revelou a presença de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ -globínicas normais e a ausência de bandas correspondentes a cadeias globínicas mutadas (Figura 28).



**Figura 28:** Separação das cadeias globínicas de um indivíduo controlo (imagem superior) e do indivíduo IX (imagem inferior) por AUT-PAGE.

### 2.1.3. ESTUDOS MOLECULARES

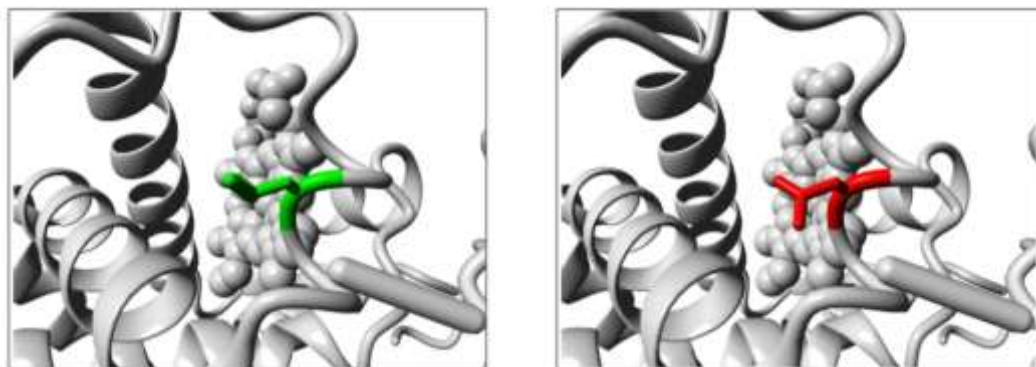
A sequenciação de ADN mostrou a presença da alteração AAG > AAT no codão 40 do gene  $\alpha 1$  (Figura 29). Esta alteração, presente em heterozigotia, resulta na síntese de uma asparagina em vez de uma lisina (Lys  $\rightarrow$  Asn). O gene  $\alpha 2$  não apresentou qualquer alteração. O indivíduo apresentou o genótipo  $\alpha\alpha^T/\alpha\alpha$ .



**Figura 29:** Sequenciação do gene  $\alpha 1$  do indivíduo IX. A seta indica a localização da alteração AAG > AAT no codão 40, presente em heterozigotia.

### 2.1.4. ESTUDOS *IN SILICO*

Os *softwares* SIFT e Polyphen-2 calcularam os seguintes *scores* 0.03 e 0.815, respetivamente. Ambos predizem que a mutação afeta a função da Hb.



**Figura 30:** Representação das diferenças estruturais entre os aminoácidos lisina (colorido a verde) e asparagina (colorido a vermelho). Imagens obtidas pelo *software* HOPE.

## 2.1.5. ESTUDOS FUNCIONAIS

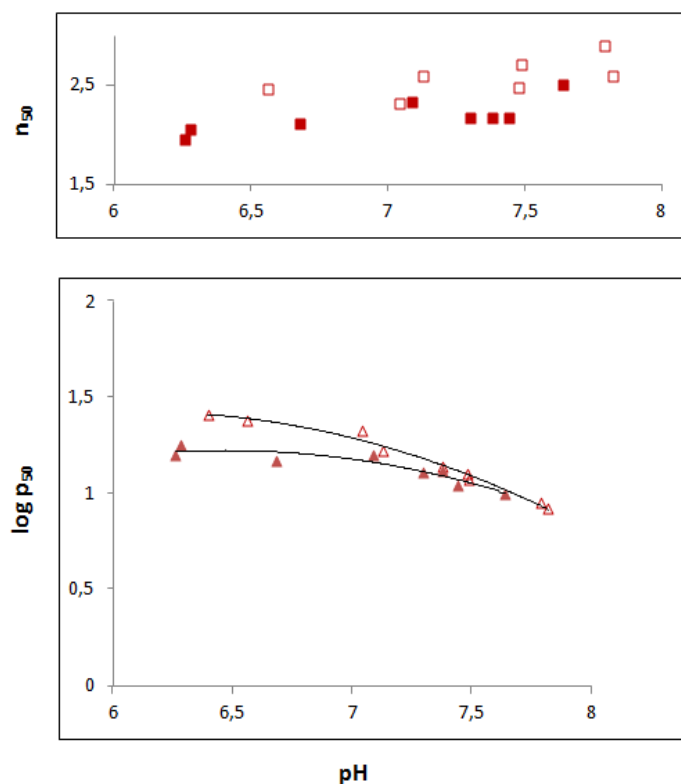
### 2.1.5.1. TESTE DE INSTABILIDADE

A incubação de hemolisados com isopropanol durante 30 minutos, a 37°C, mostrou que a variante de Hb era estável.

### 2.1.5.2. TESTES DE AFINIDADE DE O<sub>2</sub>

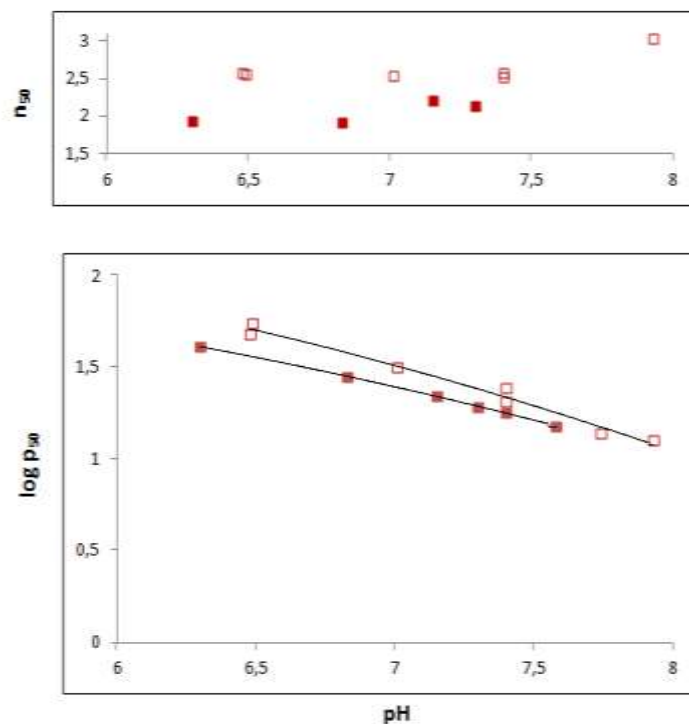
Na ausência de 2,3-DPG, a 37°C, verificou-se a ausência de variações significativas na afinidade dos hemolisados, do indivíduo IX, para o O<sub>2</sub>. Verificou-se apenas uma variação mínima no valor de p<sub>50</sub> a pH ácido quando comparado com o controlo (hemolisados de Hb A) (Figura 31).





**Figura 31:** Efeito do pH na afinidade do  $O_2$  ( $\log p_{50}$ ) e na cooperatividade ( $n_{50}$ ) de hemolisados controlo (símbolos abertos) e hemolisados do indivíduo IX (símbolos fechados), na ausência de 2,3-DPG, a  $37^\circ\text{C}$ .

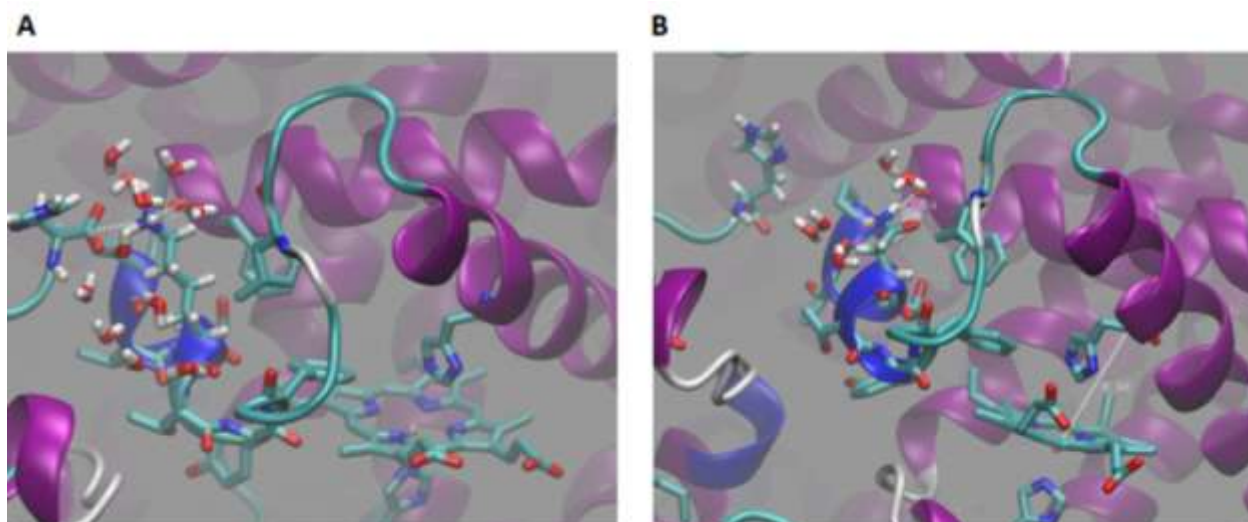
Na presença de 2,3-DPG [5 mM] os hemolisados apresentaram uma afinidade para o  $O_2$  ligeiramente superior à afinidade apresentada pelos hemolisados controlo. O valor de coeficiente de Hill ( $n_{50}$ ) apresentou-se ligeiramente reduzido (Figura 32).



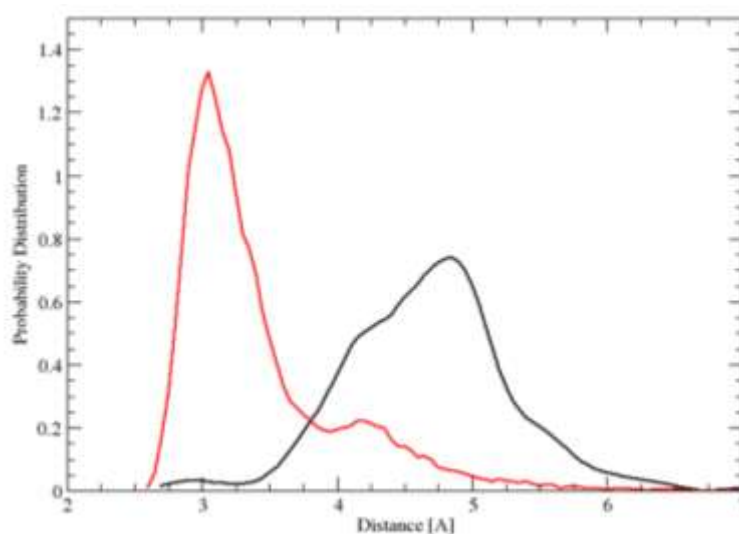
**Figura 32:** Efeito do pH na afinidade do O<sub>2</sub> (log p<sub>50</sub>) e na cooperatividade (n<sub>50</sub>) de hemolisados controlo (símbolos abertos) e hemolisados do indivíduo IX (símbolos fechados), na presença de 2,3-DPG, a 37°C.

### 2.1.6. SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR

Pelas simulações de dinâmica molecular foi possível verificar que a presença da seguinte mutação  $\alpha 40(\text{C5})(\text{Lys} \rightarrow \text{Asn})(\text{AAG} > \text{AAT})$  ( $\alpha 1$ ) leva à formação uma ponte de hidrogénio com o resíduo Phe33 na hélice B da cadeia  $\alpha$  mas não ocorre a formação de uma ponte de hidrogénio com o resíduo His146 da cadeia  $\beta$  (Figuras 33 e 34).



**Figura 33:** Representação da hélice C5 na ausência e presença da mutação  $\alpha 40(C5)(Lys \rightarrow Asn)(AAG \rightarrow AAT)$  ( $\alpha 1$ ), após 100 ns. A) Na ausência da mutação o resíduo Lys40 estabelece duas pontes de hidrogénio, uma com o resíduo Phe33, na hélice B da cadeia  $\alpha$  e outra com o resíduo His146 na cadeia  $\beta$ . B) Na presença da mutação, o resíduo Asn40 apenas estabelece uma ponte de hidrogénio com o resíduo Phe33.



**Figura 34:** Distribuição de probabilidade para as distâncias dos resíduos Lys40 (representado a preto) ou Asn40 (representado a vermelho) ao resíduo Phe33, obtida por simulações de dinâmica molecular durante 100 ns.

## 2.2. CASO CLÍNICO 10

Indivíduos X-1, X-2, XI-1, XII-1, XII-2 e XII-3

Seis indivíduos de três famílias não relacionadas apresentaram eritrocitose (excluindo o indivíduo XII-3), microcitose e hipocromia com diferentes graus de severidade (Tabela 8). Os indivíduos XII-1 e XII-3 apresentaram também anemia.

**Tabela 8:** Parâmetros hematológicos apresentados pelos indivíduos X-1, X-2, XI-1, XII-1, XII-2 e XII-3.

Indivíduos	X-1	X-2	XI-1	XII-1	XII-2	XII-3
<b>Género</b>	F	F	M	F	M	F
<b>RBC (<math>10^{12}/L</math>)</b>	5.47	5.65	6.72	5.06	5.58	4.52
<b>Hb (g/dL)</b>	12.9	13.0	15.0	11.4	14.9	9.2
<b>VGM (fL)</b>	69.8	71.1	77.1	71.1	79.9	63.9
<b>HGM (pg)</b>	23.6	23.0	22.3	22.6	26.7	20.4
<b>Reticulócitos</b>	1.12	0.85	0.80	-	1.59	1.92

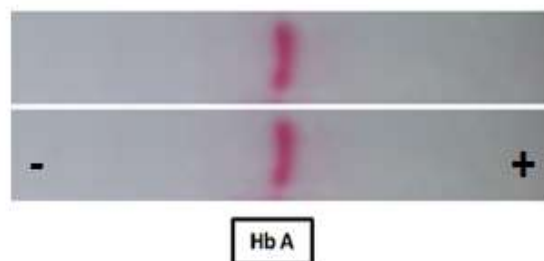
### 2.2.1 Estudo das Hbs

A quantificação das Hbs presentes, por HPLC de troca catiónica, revelou níveis normais de Hb A<sub>2</sub> e Hb F e a ausência de picos desconhecidos para todos os indivíduos (Tabela 9).

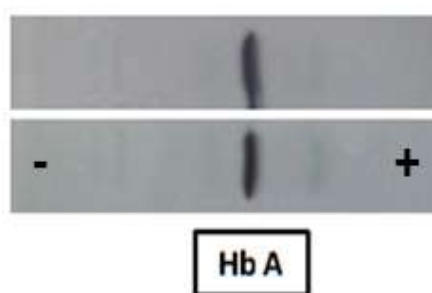
**Tabela 9:** Níveis de Hb A<sub>2</sub> e Hb F dos indivíduos X-1, X-2, XI-1, XII-1, XII-2 e XII-3, obtidos por HPLC de troca catiónica.

Indivíduos	X-1	X-2	XI-1	XII-1	XII-2	XII-3
<b>Hb A<sub>2</sub></b>	2.5	2.7	2.9	2.4	2.9	2.2
<b>Hb F</b>	0.4	0.3	0.3	0.8	1.0	0.3
<b>Perfil de HPLC</b>	AA <sub>2</sub>	AA <sub>2</sub>	AA <sub>2</sub>	AA <sub>2</sub>	AA <sub>2</sub>	AA <sub>2</sub>

A separação das Hbs por eletroforese de acetato de celulose (Figura 35) e IEF (Figura 36) revelou apenas a presença de Hb A.



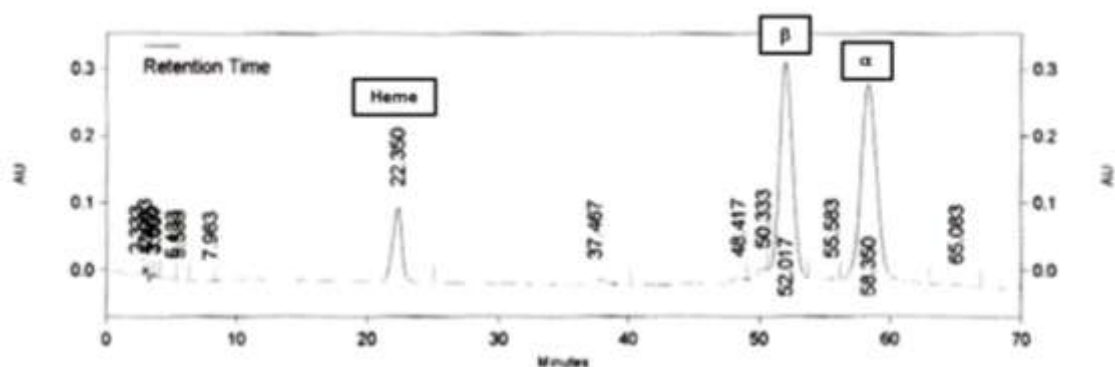
**Figura 35:** Separação das Hbs de um indivíduo controle (imagem superior) e do indivíduo XI-1 (imagem inferior), por eletroforese em acetato de celulose.



**Figura 36:** Separação das Hbs de um indivíduo controle (imagem superior) e do indivíduo XI-1 (imagem inferior), por IEF.

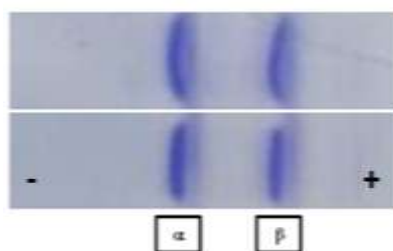
### 2.2.2 Estudo das cadeias globínicas

A separação das cadeias globínicas por HPLC de fase reversa revelou a presença de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ -globínicas nas seguintes percentagens, 46.48% e 39.64% respectivamente. O rácio de síntese das cadeias  $\alpha/\beta$ -globínicas mostrou ser 1.17. O HPLC revelou também a ausência de picos correspondentes a cadeias globínicas mutadas (Figura 37).



**Figura 37:** Separação das cadeias globínicas do indivíduo XI-1 por HPLC de fase reversa.

A separação das cadeias globínicas por AUT-PAGE revelou a presença de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ -globínicas normais e a ausência de bandas correspondentes a cadeias globínicas mutadas (Figura 38).



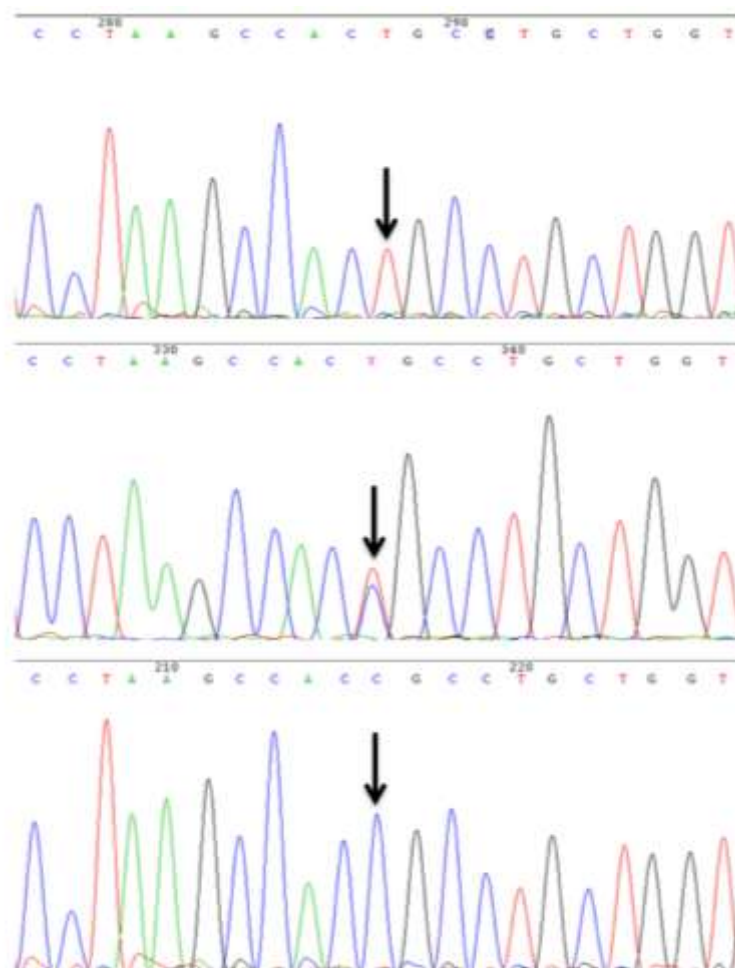
**Figura 38:** Separação das cadeias globínicas de um indivíduo controlo (imagem superior) e do indivíduo II-1(imagem inferior), por AUT-PAGE.

### 2.2.3 Estudos moleculares:

O estudo da presença das deleções mais frequentes,  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$ , por Gap-PCR multiplex, revelou a presença de  $-\alpha^{3.7}$  em heterozigotia nos indivíduos XII-1 e XII-3. O estudo da presença de grandes deleções por MLPA revelou a ausência destas em todos os indivíduos

A sequenciação de ADN mostrou a presença da alteração TGC > CGC no codão 104 do gene  $\alpha 2$  (Figura 39). Esta alteração resulta na síntese de uma arginina em vez de uma cisteína (Cys  $\rightarrow$  Arg). O gene  $\alpha 1$  não apresentou qualquer alteração. Nos indivíduos X-1, X-2, XI-1 e XII-2 a mutação apareceu em heterozigotia. Para os indivíduos XII-1 e XII-3 a mutação apareceu aparentemente em homozigotia.

Os indivíduos X-1, X-2, XI-1 e XII-2 apresentaram o genótipo  $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$ . Os restantes indivíduos, XII-1 e XII-3, apresentaram o genótipo  $\alpha^T\alpha/-\alpha^{3.7}$ .

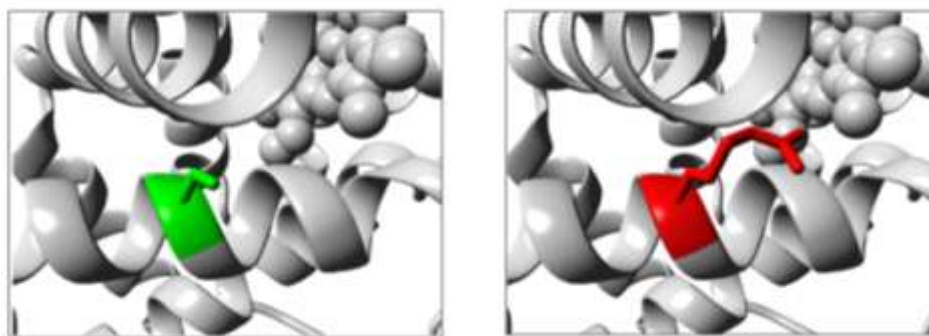


**Figura 39:** Sequenciação do gene  $\alpha 2$  de um indivíduo controlo, do indivíduo XII-2 e do indivíduo XII-3 (de cima para baixo). A seta indica a localização da alteração TGC > CGC no codão 104. Na primeira sequenciação verifica-se a ausência da mutação, na segunda a mutação surge em heterozigotia e na terceira a mutação surge aparentemente em homozigotia.

Por Real-time PCR verificou-se que o rácio de mRNA  $\alpha/\beta$  para os indivíduos XII-1, XII-2 e XII-3 era respetivamente 0.37, 1.015 e 0.38.

#### 2.2.4 Estudos *in silico*:

Os *softwares* SIFT e Polyphen-2 calcularam os seguintes *scores* 0.03 e 0.994, respetivamente. Ambos predizem que a mutação afeta a função da Hb.



**Figura 40:** Representação das diferenças estruturais entre os aminoácidos arginina (colorido a verde) e cisteína (colorido a vermelho). Imagens obtidas pelo *software* HOPE.

#### 2.2.5 Estudos funcionais:

##### 2.2.5.1 Teste de instabilidade:

A incubação de hemolisados com isopropanol durante 30 minutos, a 37°C, mostrou que a variante de Hb era estável.



