

I. Introdução

1. HEMOGLOBINA

A hemoglobina humana (Hb) é a proteína responsável pelo transporte de gases (oxigênio (O₂), dióxido de carbono (CO₂), monóxido de carbono (CO) e óxido nítrico (NO)) e nutrientes na circulação sanguínea. Esta encontra-se unicamente nos eritrócitos e em elevadas concentrações (~330 g/L) (Marengo-Rowe *et al.*, 2006, Voon *et al.*, 2008, Schechter *et al.*, 2008, Pittman *et al.*, 2011).

A Hb apresenta uma estrutura tetramérica constituída por dois pares de cadeias globínicas diferentes, que são codificadas por dois agrupamentos de genes distintos. As cadeias globínicas podem ser alfa (α), beta (β), zeta (ζ), gama (γ), epsilon (ϵ) ou delta (δ) e são produzidas durante o desenvolvimento do corpo humano, em quantidades variáveis (Figura 1). Dependendo das cadeias globínicas presentes na estrutura tetramérica de uma Hb esta pode ser conhecida por Hb Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$), Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$), Hb Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$), Hb Fetal (Hb F) ($\alpha_2\gamma_2$), Hb Adulta (Hb A) ($\alpha_2\beta_2$) ou Hb Adulta *minor* (Hb A₂) ($\alpha_2\delta_2$) (Marengo-Rowe *et al.*, 2006, Schechter *et al.*, 2008, Berg *et al.*, 2008).

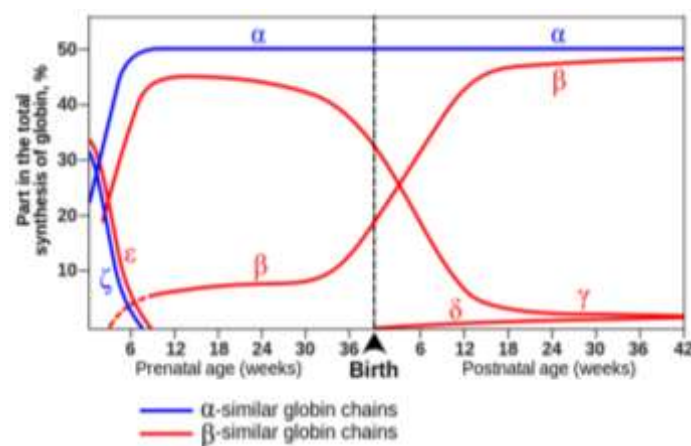


Figura 1: Níveis de produção dos diferentes tipos de cadeias globínicas durante o desenvolvimento do corpo humano. Nas primeiras semanas do período fetal ocorre a produção de cadeias globínicas ζ , ϵ , α e γ . Aproximadamente às seis semanas verifica-se uma redução

muito acentuada da produção de cadeias ζ e ϵ , e um aumento na produção das cadeias α e γ . Após o nascimento a produção das cadeias globínicas γ dá lugar à produção das cadeias β . Adicionalmente, nesta fase verifica-se a produção muito reduzida de cadeias δ . Adaptado de Schechter *et al.*, 2008.

Cada uma das cadeias globínicas da Hb encontra-se ligada a um grupo heme, o qual contém um ião ferro na sua cavidade central. Este ião coordena a seis ligandos, quatro átomos de azoto (N) que pertencem ao anel tetrapirrólico da protoporfirina, um N do grupo imidazol da histidina *proximal* (His87) e uma molécula de O₂ (Figura 2) (Clark *et al.*, 2004, Schechter *et al.*, 2008, Berg *et al.*, 2008, Gell *et al.*, 2009, Pittman *et al.*, 2011). Para que ocorra a ligação reversível de O₂ à Hb é necessário que o ião ferro encontre-se no estado ferroso (Fe²⁺).

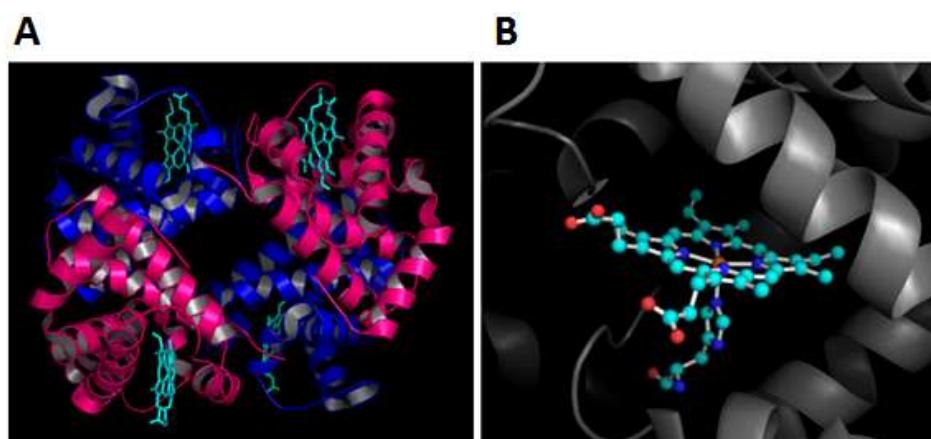


Figura 2: Constituição da Hb A na forma desoxigenada (A) e do grupo heme (B). A) A Hb A é constituída por quatro cadeias globínicas, duas do tipo α (coloridas a rosa) e duas do tipo β (coloridas a azul escuro). Cada cadeia liga a um grupo heme (colorido a azul claro). B) O grupo heme apresenta na sua cavidade central um ião ferro (colorido a vermelho), que coordena a seis ligandos, cinco átomos N (coloridos a azul escuro) e uma molécula de O₂. Quando a Hb encontra-se desoxigenada a molécula de O₂ não está ligada ao grupo heme. Imagens obtidas pelo programa PyMOL versão 1.5 e utilizando o ficheiro PDB ID: 2HHB.

Uma criança saudável com zero dias de vida apresenta nos seus eritrócitos aproximadamente 80% de Hb F e 20% de Hb A₂, em relação à Hb total. Ao completar

os seis meses de idade, os seus eritrócitos contêm aproximadamente 97% de Hb A, 2 a 3.5% de Hb A₂ e níveis de Hb F inferiores a 1%. Este último perfil mantém-se nos adultos (Schechter *et al.*, 2008, Muncie *et al.*, 2009).

1.1. HEMOGLOBINA ADULTA

Tal como referido anteriormente a Hb A é constituída por duas cadeias α -globínicas e duas cadeias β -globínicas e apresenta um peso total de 64 kDa.

A síntese das cadeias α e β -globínicas é regulada pela presença de dois agrupamentos de genes, em que um está localizado no cromossoma 16 (16p13.3) e o outro no cromossoma 11 (11p15.5). Em cada um dos agrupamentos os genes funcionais encontram-se organizados na ordem em que são expressos (Schechter *et al.*, 2008, Suemasu *et al.*, 2011, Pellegrini *et al.*, 2011). O agrupamento de genes que regula a produção das cadeias α -globínicas abrange três genes funcionais que são, HBZ (ζ), HBA2 (α_2) e HBA1 (α_1) (Figura 3) (Pellegrini *et al.*, 2011, Suemasu *et al.*, 2011, Wilber *et al.*, 2011). Por outro lado, o agrupamento de genes que regula a produção das cadeias β -globínicas é constituído por cinco genes funcionais sendo estes, HBE (ϵ), HBG2 ($G\gamma$), HBG1 ($A\gamma$), HBD (δ) e HBB (β) (Pellegrini *et al.*, 2011).

Os genes α_2 e α_1 apresentam sequências nucleotídicas similares e codificam a mesma proteína (Figura 4A) (Voon *et al.*, 2008, Moradkhani *et al.*, 2009). Tem-se verificado que α_2 é expresso 2-3 vezes mais que α_1 (Voon *et al.*, 2008) e que a regulação da expressão destes genes depende principalmente da presença de HS-40, uma sequência conservada hipersensível à ação da enzima DNase I (Gobbi *et al.*, 2007, Rugless *et al.*,

2008, Schechter *et al.*, 2008, Voon *et al.*, 2008, Vernimmen *et al.*, 2009, Suemasu *et al.*, 2011).

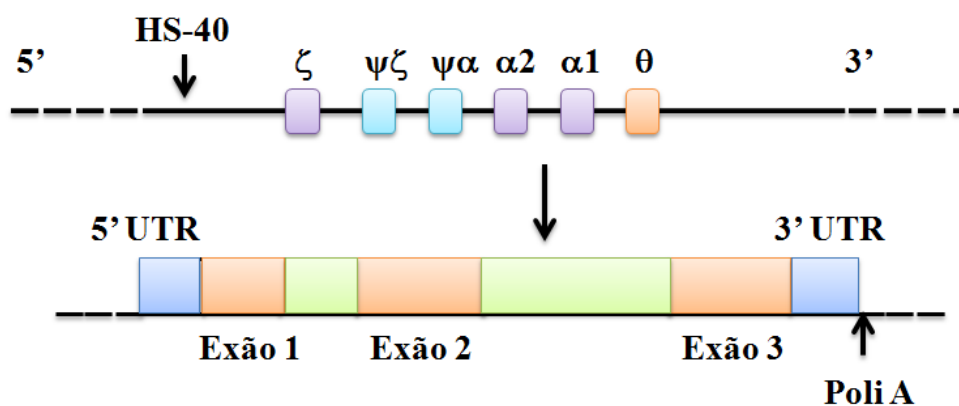


Figura 3: Agrupamento de genes responsável pela síntese das cadeias α e ζ -globínicas e constituição dos genes α . O agrupamento encontra-se localizado em 16p13.3 e é constituído por três genes funcionais (ζ , $\alpha 2$ e $\alpha 1$) (coloridos a roxo), um gene com função desconhecida (θ) (colorido a laranja) e dois pseudogenes ($\psi\zeta$ e $\psi\alpha$) (coloridos a azul claro). A subunidade HS-40, assinalada por uma seta, regula a expressão dos genes funcionais. As estruturas dos genes $\alpha 2$ e $\alpha 1$ são similares e englobam três exões (coloridos a laranja), dois intrões (coloridos a verde) e duas regiões sem tradução (coloridas a azul). Adaptado de Clark *et al.*, 2004.

Já os níveis de expressão do gene β são regulados pela presença de uma região controladora do *locus* (LCR) que é composta por cinco locais hipersensíveis à ação da DNase I (Schechter *et al.*, 2008, Pellegrini *et al.*, 2011).

As cadeias α e β -globínicas apresentam uma estrutura primária constituída por 141 e 146 aminoácidos, respetivamente. As estruturas secundárias de ambas as cadeias são caracterizadas pela presença de sete e oito segmentos de hélice α , respetivamente, sendo estas designadas por uma letra de A a H (Figura 4B) (Manca e Masala, 1992, Schechter *et al.*, 2008). As várias hélices organizam-se originando uma estrutura globular compacta que pode heterodimerizar e originar a estrutura tetramérica da Hb (Schechter *et al.*, 2008).

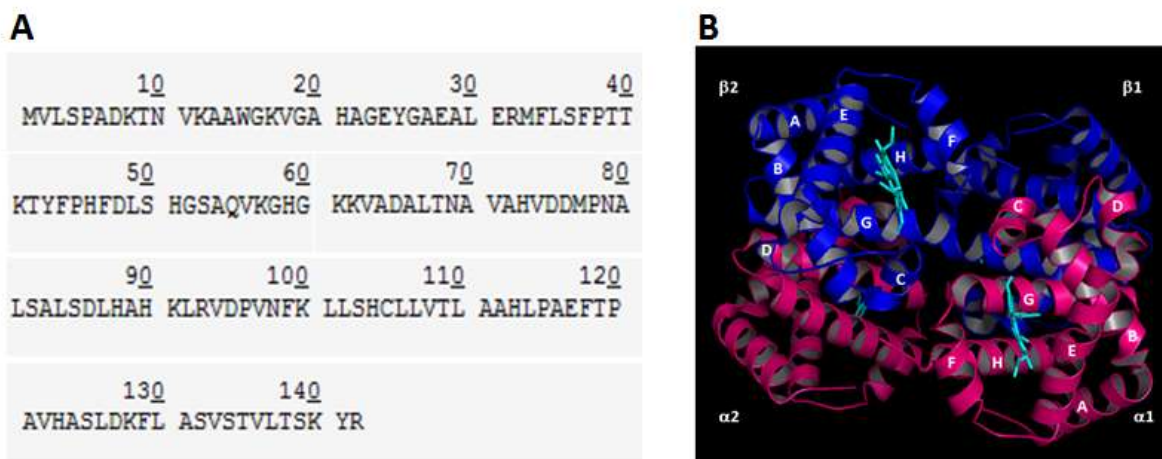


Figura 4: Sequência de aminoácidos das cadeias α -globínicas (A) e posição das hélices na Hb (B). Os genes $\alpha 2$ e $\alpha 1$ codificam a mesma proteína que é constituída por 141 aminoácidos. Os primeiros dois aminoácidos, Val1 e Leu2 encontram-se em NA1 e NA2 respetivamente. Os aminoácidos Ser3 a Gly18 estão na hélice A. O resíduo Ala19 encontra-se na dobra AB. Os aminoácidos His20 a Ser35 encontram-se na hélice B. Os seguintes sete aminoácidos, Phe36 a Tyr42 estão na hélice C. Os resíduos Phe43 a Gly51 encontram-se na dobra CE e os resíduos Ser52 a Ala71 estão na hélice E. Os aminoácidos Leu80 a Ala88 encontram-se na hélice F e os próximos cinco, de His89 a Val93 na dobra FG. Os aminoácidos Asp94 a His112 estão na hélice G, seguindo-se os aminoácidos Leu113 a Phe117 que estão na dobra GH. Os resíduos Thr118 a Ser138 encontram-se na hélice H e os restantes três aminoácidos, Lys139, Tyr140 e Arg141 estão em HC (Manca e Masala, 1992). Sequência retirada da base de dados Uniprot, P69905 (HBA HUMAN).

A montagem do tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ origina interfaces α - α (designada por $\alpha_1\alpha_2$), β - β (designada por $\beta_1\beta_2$) e α - β (designadas por $\alpha_1\beta_1$ ou $\alpha_1\beta_2$). As interfaces $\alpha_1\alpha_2$ e $\beta_1\beta_2$ formam um canal e apresentam locais de ligação para efetores alostéricos. Apenas se verifica a ocorrência de contatos diretos entre as subunidades da interface $\alpha_1\alpha_2$, ocorrendo interações iónicas entre o resíduo Arg141 α (localizado no C-terminal) de uma cadeia α e os resíduos Asp126 α e Lys127 α localizados na cadeia α oposta. Contrariamente, as subunidades das interfaces $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_1\beta_1$ apresentam contatos extensivos. A interface $\alpha_1\beta_2$ é altamente polar e dinâmica e a interface $\alpha_1\beta_1$ é estática e menos polar (Kavanaugh *et al.*, 2001).

Desta forma, verifica-se que as cadeias α são constituídas por diferentes aminoácidos que contribuem mais ou menos para a estabilidade e função da Hb. Esta contribuição depende da localização dos mesmos e das suas propriedades. Os aminoácidos mais importantes localizam-se nos contatos de empacotamento e nos contatos deslizantes, na zona de ligação da proteína estabilizante de α -Hb (AHSP) e no contato com o grupo heme (Tabela 1) (Manca e Masala, 1992, Yu *et al.*, 2009).

1.1.1. CONTATOS $\alpha\beta$

As interfaces α - β , presentes na Hb A, apresentam contatos extensivos que são conhecidos por contatos de empacotamento ($\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$) e contatos deslizantes ($\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$) (Kavanaugh *et al.*, 2001, Shikama *et al.*, 2003, Baudin-Creuzza *et al.*, 2004, Manconi *et al.*, 2010). Os contatos de empacotamento são formados maioritariamente por aminoácidos dispostos nas hélices B, G e H e na dobra GH, e intervêm principalmente ao nível da estabilização das ligações de O₂ à Hb. A formação correta

destes evita a oxidação do grupo heme. Os contatos deslizantes incluem maioritariamente aminoácidos das hélices C e G e da dobra FG e intervêm principalmente ao nível da ligação cooperativa das moléculas de O₂ à Hb, ou seja na afinidade da proteína para o O₂ (Shikama *et al.*, 2003, Manconi *et al.*, 2010).

1.1.2. AHSP

A AHSP é uma pequena proteína (12 kDa) de origem eritróide, que apresenta um papel regulador na estabilidade, estrutura e montagem das cadeias α -globínicas (Gell *et al.*, 2002, Baudin-Creuzza *et al.*, 2004, Favero *et al.*, 2011, Szolajska *et al.*, 2011).

Uma das funções principais da AHSP é ligar especificamente às cadeias α -globínicas livres, na ausência de cadeias β disponíveis, e formar complexos estáveis e reversíveis. As cadeias α podem estar ligadas ou não ao grupo heme, ou seja na forma apo- α Hb ou holo- α Hb (com o ião ferro no estado oxidado (FeIII) ou reduzido (FeII)), respetivamente. Desta forma a AHSP evita que ocorra a agregação das cadeias α e a sua consequente precipitação, limitando a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Gell *et al.*, 2002, Baudin-Creuzza *et al.*, 2004, Feng *et al.*, 2004, Voon *et al.*, 2008, Gell *et al.*, 2009, Mollan *et al.*, 2010, Szolajska *et al.*, 2011, Favero *et al.*, 2011).

A AHSP é constituída por três hélices α antiparalelas alongadas. As duas primeiras hélices e segmentos intervenientes da AHSP reconhecem as hélices G e H das cadeias α envolvidas sobretudo nos contatos $\alpha_1\beta_1$ (Figura 5) (Brillet *et al.*, 2010, Wajcman *et al.*, 2011, Zanella-Cleon *et al.*, 2008).

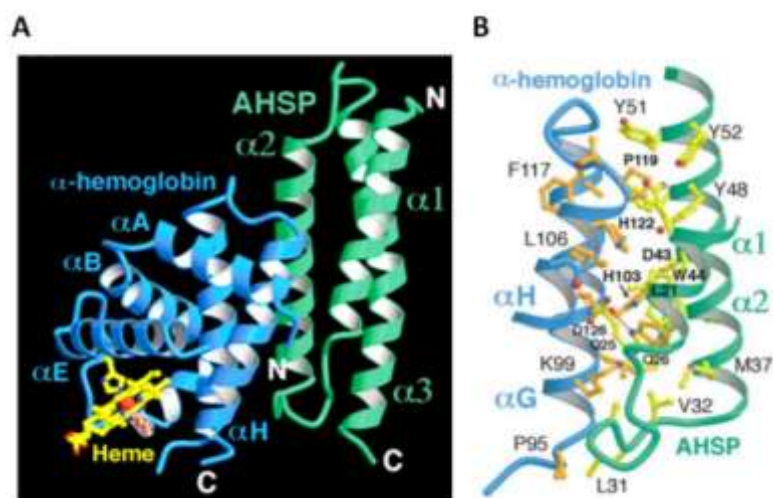


Figura 5: A) Estrutura do complexo α -Hb-AHSP. A cadeia α -globínica e a AHSP encontram-se coloridas a azul e verde, respetivamente. B) Representação dos aminoácidos envolvidos no complexo α -Hb-AHSP. As cadeias laterais dos aminoácidos da cadeia α e da proteína AHSP que participam no complexo encontram-se coloridas a laranja e amarelo, respetivamente. As pontes de hidrogénio (H) surgem a vermelho (a tracejado) e os átomos de O e N encontram-se coloridos a vermelho e azul, respetivamente. Os aminoácidos mais importantes da cadeia α para o contato α -Hb-AHSP são Lys99, His103, Phe117 e Pro119. Adaptado de Feng *et al.*, 2004.

Tabela 1: Lista de aminoácidos das cadeias α -globínicas que contribuem muito para a estrutura e/ou função da Hb. Estes encontram-se dispostos nos contatos $\alpha\beta$, na zona da ligação da AHSP e no contato com o grupo heme (Manca e Masala, 1992, Yu *et al.*, 2009).

Localização na Hb	Aminoácidos
Contatos deslizantes $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$	Pro37, Thr38, Lys40, Thr41, Tyr42, Pro44, Ala88, Leu91, Arg92, Asp94, Pro95, Val96, Asn97, Tyr140, Arg141
Contatos de empacotamento $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$	Arg31, Leu34, Ser35, Phe36, His103, Leu106, Val107, Ala110, Ala111, Pro114, Phe117, Thr118, Pro119, His122, Ala123, Asp126
Locais de ligação da AHSP	Lys99, His103, Phe117, Pro119, Ala123, Asp126
Contato com o grupo heme	Met32, Thr39, Tyr42, Phe43, His45, Phe46, His58, Val62, Leu83, Leu86, His87, Leu91, Val93, Asn97, Phe98, Leu101, Leu129, Val132, Leu136

1.1.3. FUNÇÃO DA Hb A

A principal função da Hb é realizar o transporte de O₂ dos pulmões para os restantes tecidos do corpo, de forma controlada e eficiente. Esta é uma proteína alostérica e cooperativa.

O processo de oxigenação ocorre devido a alterações na estrutura quaternária da Hb (Figura 6). Esta pode-se apresentar na forma relaxada (R ou oxi-Hb) ou na forma tensa (T ou desoxi-Hb), estando associadas a alta e baixa afinidade para o O₂, respetivamente (Bruno *et al.*, 2001, Noble *et al.*, 2002, Shikama *et al.*, 2003, Nagatomo *et al.*, 2005, Schay *et al.*, 2006, Kovalevsky *et al.*, 2010). Por outro lado a ligação de uma molécula de O₂ a uma subunidade da Hb leva a que ocorra a ligação de outras moléculas de O₂, às subunidades livres, com maior afinidade (Lukin *et al.*, 2003, Fischer *et al.*, 2011, Steinberg *et al.*, 2011).

A ligação de moléculas de O₂ à Hb pode ser modulada pela presença de efetores heterotrópicos, tais como, iões hidrogénio (H⁺) e (2,3-DPG). A presença de H⁺ associada à diminuição do pH é conhecida por efeito de Bohr. A presença de H⁺ e 2,3-DPG diminui a afinidade da Hb para o O₂ (Lukin *et al.*, 2003, Nagatomo *et al.*, 2005, Marengo-Rowe *et al.*, 2006, Kovalevsky *et al.*, 2010).

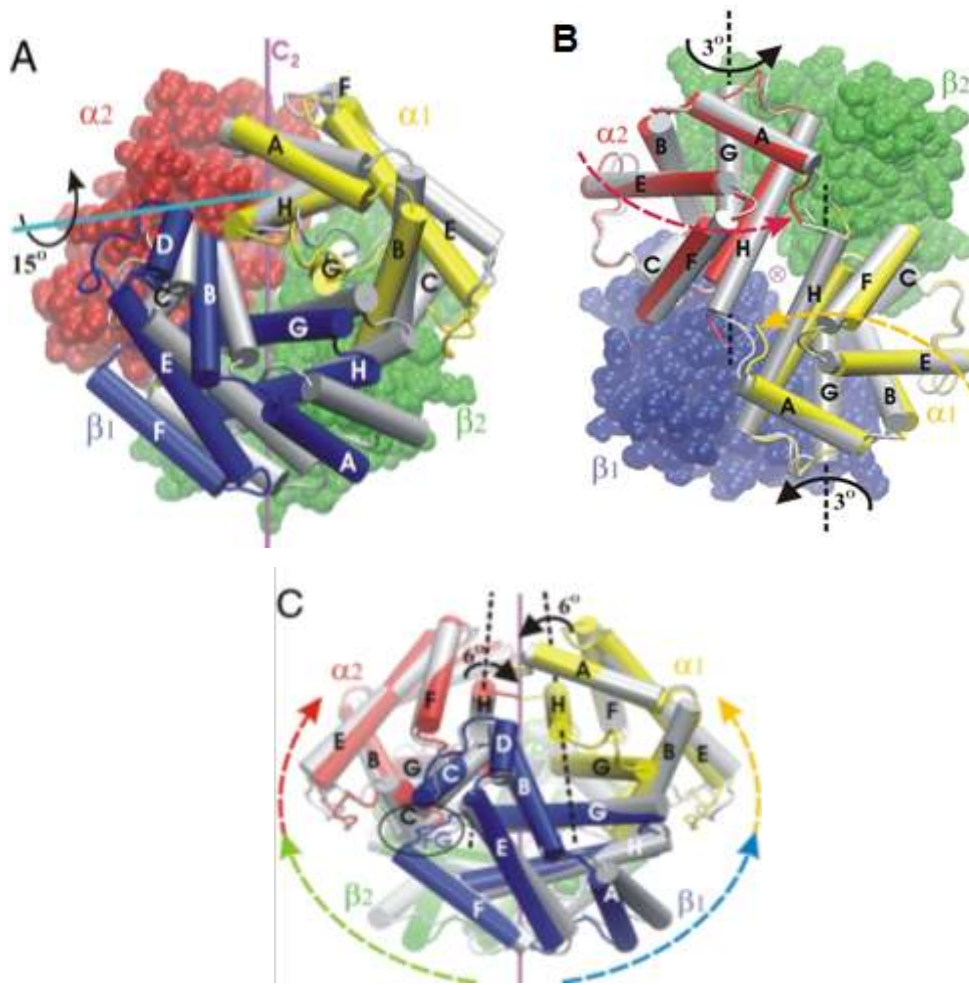


Figura 6: Mecanismo associado à ligação de moléculas de O_2 à Hb, ocorrendo desta forma a transição desoxi-Hb (representada a cor) \rightarrow oxi-Hb (representada a cinzento). A) Resumidamente, a ligação de O_2 à Hb provoca uma rotação de aproximadamente 15° do dímero $\alpha_1\beta_1$ relativamente ao dímero $\alpha_2\beta_2$ e ocorre uma redução no tamanho do canal. B) De seguida verifica-se uma nova rotação de aproximadamente 3° , das cadeias α em torno da hélice G. C) Por fim os dímeros $\alpha\beta$ sofrem uma rotação de 6° em torno das hélices de α -Hb. Retirado de Fischer *et al.*, 2011.

2. HEMOGLOBINOPATIAS

A presença de mutações que afetem o padrão normal de expressão dos genes globínicos leva ao aparecimento das hemoglobinopatias, sendo estas um dos maiores problemas de saúde a nível mundial. A Organização Mundial de Saúde (WHO) estima que aproximadamente 7% da população mundial é portadora de um tipo de hemoglobinopatia (Olufeni *et al.*, 2011, Wajcman *et al.*, 2011, Kohne *et al.*, 2011).

Em Portugal, na população nativa portuguesa, verifica-se uma baixa prevalência das hemoglobinopatias, sendo estas mais frequentes nas zonas Centro e Sul do país. Por outro lado, tem-se verificado um aumento acentuado no número de imigrantes (principalmente vindos de África, Brasil, Europa do Leste e Ásia) a viver em Portugal, tornando desta forma as hemoglobinopatias mais frequentes (Bento *et al.*, 2006).

As hemoglobinopatias foram identificadas inicialmente na zona do Mediterrâneo e em algumas zonas dos continentes Ásia e África, principalmente em regiões associadas a altas taxas de ocorrência de malária (Figura 7). O aumento da taxa migratória tem levado a uma distribuição das hemoglobinopatias por todo o mundo (Harteveld *et al.*, 2010, Weatherall *et al.*, 2011).

As mutações podem originar alterações qualitativas ou quantitativas, resultando na síntese de Hbs com estrutura alterada (variantes de Hb) ou síntese de cadeias globínicas em níveis reduzidos (talassémias) (Clark *et al.*, 2004, Kohne *et al.*, 2011).

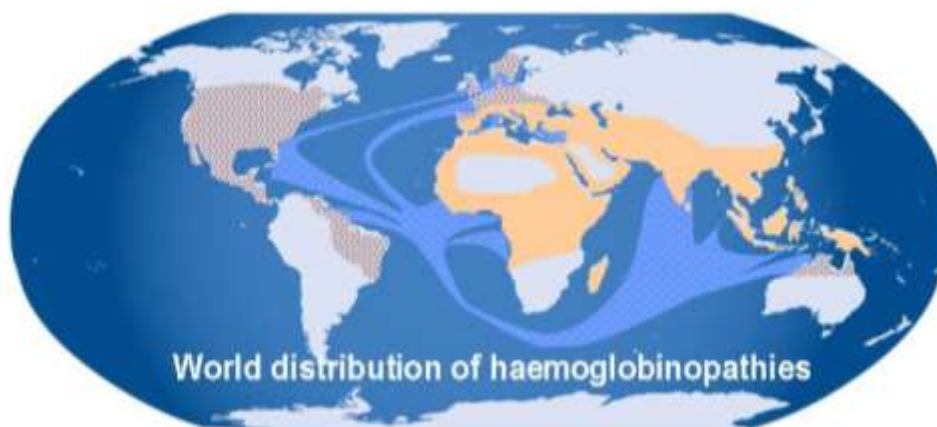


Figura 7: Distribuição mundial das hemoglobinopatias e sobreposição com a distribuição geográfica da malária. Retirado de Hartevelde *et al.*, 2010.

Na maioria dos casos, os indivíduos portadores de hemoglobinopatias são assintomáticos. Por outro lado, os indivíduos que apresentam a mutação ou várias mutações em homozigotia apresentam um fenótipo clínico grave (Clark *et al.*, 2004).

2.1. TALASSÉMIAS

As talassémias são caracterizadas por uma redução na taxa de síntese das cadeias globínicas, devido à presença de mutações nos respetivos genes globínicos (Sarnaik *et al.*, 2005). A redução poderá ser total ou apenas parcial, resultando desta forma num fenótipo de talassémia 0 ou talassémia + (Sarnaik *et al.*, 2005, Vichinsky *et al.*, 2009, Hartevelde *et al.*, 2010, Fucharoen *et al.*, 2011).

Os genes α e β -globínicos são os genes mais afetados com este tipo de doença (Sarnaik *et al.*, 2005, Kohne *et al.*, 2011). As α -talassémias têm como origem frequente a presença de deleções que envolvam um ou os dois genes α -globínicos de cada

cromossoma. As β -talassémias apresentam as mutações pontuais como origem mais frequente (Clark, *et al.*, 2004).

2.1.1. α -TALASSÉMIAS

As α -talassémias apresentam uma redução na síntese das cadeias α -globínicas, devido principalmente à presença de deleções que envolvam um ou os dois genes α -globínicos de um cromossoma. Algumas mutações pontuais, normalmente no gene α_2 , têm sido associadas a um fenótipo talassémico (Clark *et al.*, 2004, Sarnaik *et al.*, 2005, Harteveld *et al.* 2010, Nadkarni *et al.* 2010, Fucharoen *et al.* 2011).

As deleções mais frequentes são $-\alpha^{3.7}$ (principalmente em indivíduos de África, Mediterrâneo, Ásia e Médio Oriente), $-\alpha^{4.2}$ (maioritariamente em indivíduos da Ásia, Mediterrâneo, Médio Oriente, Pacífico e Sudeste Asiático) e $-\text{SEA}$ (principalmente em indivíduos da China e Sudeste Asiático) (Clark *et al.*, 2004, Wajcman *et al.*, 2008)

Um indivíduo saudável apresenta quatro genes α -globínicos ativos, correspondendo ao genótipo $\alpha\alpha/\alpha\alpha$. Na presença de α -talassémia o genótipo apresentado pelo indivíduo será diferente. Desta forma quando um dos genes α de um indivíduo se encontra afetado (estado silencioso), este apresenta um dos seguintes genótipos, $-\alpha/\alpha\alpha$ ou $\alpha\alpha^T/\alpha$, que correspondem respetivamente à presença de uma deleção ou de uma mutação pontual. Dois genes α afetados, em *trans* ($-\alpha/-\alpha$) ou em *cis* ($\alpha\alpha--$), resultam no aparecimento de α -talassémia *minor*, que é caracterizada por um rácio de síntese das cadeias globínicas α/β próximo de 0.6. Quando apenas um gene α se encontra ativo e os restantes três genes encontram-se mutados, surge a α -talassémia intermédia (doença de Hb H),

associada a um dos seguintes genótipos $--/\alpha$ ou $--/\alpha\alpha^T$. A taxa de síntese das cadeias α encontra-se bastante reduzida. Em casos extremos, os quatro genes α de um indivíduo podem-se encontrar inativos resultando em α -talassémia *major* (Síndrome de hidrósia fetal). A síntese das cadeias α é nula, resultando na presença de anemia intrauterina severa e morte fetal ou poucas horas após o nascimento do indivíduo (Tabela 2) (Sarnaik *et al.*, 2005, Muncie *et al.*, 2009, Harteveld *et al.* 2010, Nadkarni *et al.* 2010). A severidade do fenótipo apresentado está relacionada diretamente com o número de genes α -globínicos afetados. Em geral, o fenótipo associado à ocorrência de α -talassémia é caracterizado por um grau variável de anemia, diminuição dos valores de Hb globular média (HGM) e volume globular médio (VGM), níveis de Hb A₂ normais ou ligeiramente reduzidos e níveis de Hb F normais. No período fetal podem surgir também tetrâmeros de cadeias γ - Hb Bart e no período pós-natal podem surgir tetrâmeros de cadeias β - Hb H (Harteveld *et al.* 2010, Nadkarni *et al.* 2010, Suemasu *et al.*, 2011).

Tabela 2: Fenótipos, número de genes α -globínicos ativos, rácio das cadeias globínicas α/β , haplótipos e genótipos apresentados na presença de α -talassémia.

Fenótipo	#genes α -globínicos	Rácio das cadeias globínicas α/β	Haplótipo	Genótipo
Normal	4	1	α, α	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Estado silencioso	3	0.8	α^+, α	$-\alpha/\alpha\alpha$
Talassémia <i>minor</i>	2	0.6	α^0, α or α^+, α^+	$--/\alpha\alpha$ or $-\alpha/-\alpha$
Talassémia intermédia	1	0.3	α^0, α^+	$--/\alpha$
Talassémia <i>major</i>	0	0	α^0, α^0	$--/--$

2.2. VARIANTES DE Hb

As variantes de Hb são caracterizadas pela presença de mutações nos genes globínicos, que podem ser substituições, deleções ou inserções de um ou mais nucleótidos (Anexo 1). Desta forma são sintetizadas cadeias globínicas com a sequência de aminoácidos alterada. Em 95% dos casos as variantes de Hb resultam de mutações pontuais – mutações *missense* (Fais *et al.*, 2010).

O local afetado e a natureza dos aminoácidos envolvidos determina a gravidade do fenótipo associado à variante de Hb. Estas podem apresentar vários fenótipos, caracterizados por, formação de células falciformes, instabilidade, afinidade para o O₂ alterada (diminuída ou aumentada), capacidade de transporte de O₂ diminuída e fenótipo talassémico (Kohne *et al.*, 2011, Fais *et al.*, 2010). Na maioria dos casos as variantes quando em heterozigotia são assintomáticas.

De acordo com os dados inseridos na base de dados HbVar encontram-se descritas 1162 variantes estruturais de Hb. As variantes mais frequentes resultam de mutações nos genes α e β -globínicos, estando associadas a percentagens de 36.57% e 49.14%, respetivamente (Tabela 3).

Ao nível dos genes α -globínicos encontram-se descritas 424 variantes, sendo que 141 ocorrem no gene $\alpha 2$, 87 no gene $\alpha 1$ e 197 ocorrem em ambos os genes.

As variantes, Hb J-Paris-I [$\alpha 12$ (A10)Ala→Asp (GCC>GAC) ($\alpha 2$ ou $\alpha 1$)], Hb Lisbon [$\alpha 23$ (B4)Glu→Asp (GAG>GAT) ($\alpha 2$ ou $\alpha 1$)], Hb Evora [$\alpha 35$ (B16)Ser→Pro (TCC>CCC) ($\alpha 2$)], Hb Parma [A2] [$\alpha 59$ (E8)Gly→Ser (GGC>AGC) ($\alpha 2$)], Hb G-Georgia [$\alpha 95$ (G2)Pro→Leu (CCG>CTG) ($\alpha 2$)], Hb Palmela [$\alpha 115$ (GH3)Ala→Val (GCC>GTC) ($\alpha 1$)], Hb Portimão [$\alpha 132$ (H15)Val→Met (GTG>ATG) ($\alpha 1$)], Hb Esch

[Ala-Leu-Thr-Asn-inserção entre os codões 68(E17) e 69(E18) ($\alpha 1$)] e Hb Basel [$\alpha 14(A12)Trp \rightarrow Leu$ (TGG>TTG) ($\alpha 1$)] foram identificadas pela primeira vez em população de origem portuguesa.

Tabela 3: Número de variantes estruturais identificadas nos diferentes genes globínicos e a respetiva percentagem.

Genes globínicos	Número de variantes descritas	Percentagem (%)
HBE	0	0
HBZ	0	0
HBZ1	0	
HBZ2	0	
HBA	425	36.57
HBA2	338	
HBA1	284	
HBG	97	8.35
HBG2	58	
HBG1	39	
HBD	69	5.94
HBB	571	49.14
Total	1162	100.00

2.2.1. VARIANTES QUE ORIGINAM CÉLULAS FALCIFORMES

A presença de mutações missense, principalmente ao nível das cadeias β -globínicas (por exemplo Hb S [$\beta 6(A3)Glu \rightarrow Val$ (GAG>GTG)]) podem levar à polimerização das cadeias mutadas, devido à baixa solubilidade das mesmas. Desta forma, os eritrócitos sofrem desidratação e apresentam uma estrutura alongada associada a uma baixa flexibilidade, dificultando a circulação destas no fluxo sanguíneo. A nível clínico pode-

se verificar a ocorrência de hemólise crônica e vaso-oclusão intravascular (Wu *et al.*, 2005, Steinberg *et al.*, 2008).

2.2.2. VARIANTES INSTÁVEIS

A estabilidade da estrutura tetramérica da Hb depende principalmente da posição molecular dos resíduos não polares (que se encontram principalmente no interior da proteína) e dos contatos de empacotamento ($\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$). Estes mantêm as quatro cadeias globínicas juntas e controlam a proximidade com o grupo heme (Wajcman *et al.*, 2008).

Ao nível dos contatos $\alpha_1\beta_1$ as variantes instáveis surgem principalmente devido a mutações nas hélices C, G e H, que podem destabilizar os contatos hidrofóbicos internos e/ou a interface $\alpha_1\beta_1$ (Wajcman *et al.*, 2008).

Os mecanismos fisiológicos responsáveis pela instabilidade das cadeias globínicas mutadas e pela baixa síntese das mesmas não são claros. É proposto que, a formação de ARN mensageiro instável com um curto período de vida leve a uma baixa expressão de variantes instáveis; a presença de variantes instáveis aumentam a tendência para a desagregação dos grupos heme das cadeias globínicas levando à produção de ROS que podem levar à ocorrência de eritropoiese ineficiente e apoptose; por último, as cadeias mutadas podem não apresentar a capacidade de ligar à AHSP, não ocorrendo o processo de destoxificação (Wajcman *et al.*, 2008).

As Hbs instáveis tendem a precipitar nos eritrócitos e a formar corpos de Heinz, podendo levar ao aparecimento de anemia hemolítica (Sarnaik, *et al.*, 2005, Wajcman *et*

al., 2008, Manconi *et al.*, 2010). Estas estão muitas vezes associadas a um fenótipo de α -talassémia (Garçon *et al.*, 2010).

2.2.3. VARIANTES COM AFINIDADE PARA O O₂ ALTERADA

Em indivíduos com Hb normal a curva de dissociação do oxigénio representa a reação da Hb com as moléculas de O₂, a qual deverá apresentar uma forma sigmoideal devido à presença de cooperatividade. Esta pode ser modificada devido ao efeito de Bohr, mudanças de temperatura e presença de 2,3-DPG (Marengo-Rowe *et al.*, 2006).

A presença de mutações principalmente ao nível dos contatos $\alpha_1\beta_2$ pode alterar a afinidade da molécula por O₂ a qual será facilmente identificada pela curvas de dissociação do oxigénio correspondentes (Sarnaik *et al.*, 2005). Podem também se verificar mutações na zona de contato com o grupo heme e na zona de ligação do 2,3-DPG (Sarnaik *et al.*, 2005, Marengo-Rowe *et al.*, 2006).

As variantes caraterizadas por um fenótipo de alta afinidade apresentam uma curva de dissociação de oxigénio desviada para a esquerda, já as variantes com fenótipo de baixa afinidade apresentam uma curva desviada para a direita (Marengo-Rowe *et al.*, 2006).

A nível clínico, os indivíduos com Hbs de alta afinidade podem apresentar eritrocitose, e os indivíduos com Hbs de baixa afinidade podem apresentar cianose.

2.2.4 VARIANTES COM CAPACIDADE DE TRANSPORTE DE O₂ DIMINUÍDA

O ião ferro do grupo heme deve encontrar-se no estado de oxidação 2+ permitindo assim a combinação com O₂. Se ocorrer oxidação, o ião encontrar-se-á no estado de

oxidação 3+ (estado férrico) e a Hb passa a ser conhecida por meta-hemoglobina a qual é caracterizada por ser não funcional (Sarnaik *et al.*, 2005, Marengo-Rowe *et al.*, 2006, Kutlar *et al.*, 2009). A nível clínico surge a patologia cianose.

Por outro lado se ocorrerem mutações ao nível das hélices E e F, as quais entram na constituição da zona de ligação ao grupo heme, surgem as Hbs M (Marengo-Rowe *et al.*, 2006, Kutlar *et al.*, 2009)

2.2.5 VARIANTES TALASSÉMICAS

As variantes talassémicas apresentam mutações do tipo não deletional que levam à redução da síntese das cadeias globínicas, podendo afetar o processamento do ARNm, a tradução do ARNm, os processos pós-tradução e consequentemente a estabilidade das cadeias (Harteveld *et al.*, 2010). Desta forma não ocorre uma correta formação da estrutura tetramérica da Hb e surge um fenótipo de talassémia (Wajcman *et al.*, 2008).

As mutações anteriormente referidas ocorrem normalmente ao nível dos contatos $\alpha_1\beta_1$, ou seja nas hélices C, G e H, ou na região de contato com a AHSP (Wajcman *et al.*, 2008).

